Analyse des Mosaik-Genes COB in der mtDNS der Bäcker-Hefe

Helga Bechmann-Holzner

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535726_0044

Analyse des Mosaik-Genes COB in der mtDNS der Bäcker-Hefe.

DISSERTATION
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von
Helga Bechmann-Holzner
aus Breslau

München, Juli 1981.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Kaudewitz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. J. Schweyen

Tag der mündlichen Prüfung: 12. November 1981

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	Einleitung	1
B.	Material und Methoden	8
1.	Nomenklatur und Abkürzungen	8
1.1.	genetische Begriffe	8
1.2.	Abkürzungen	8
2.	Stämme	9
3.	Medien und Feinchemikalien	10
4.	Methoden	13
4.1.	Kartierung der cob-Mutationsorte	13
4.1.1.	mit^-_x x mit^-_y Rekombinationsanalyse	13
4.1.2.	mit^- x rho^- Deletionskartierung	13
4.2.	Wachstumsverhalten	13
4.3.	Cytochromspektren	14
4.4.	Radioaktive Markierung mitochondrialer Translationsprod.	14
4.5.	SDS-Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese	15
4.6.	Eindimensionale Peptidkartierung	15
4.7.	Immunologische Methoden	16
4.7.1.	Immunpräzipitation	16
4.7.2.	Immun-Replika	17
C.	Ergebnisse	18
1.	Genetische Karte der COB-Region	18
1.1.	rho^--Deletionskartierung	18
1.2.	cob^-_x x cob^-_y Rekombinationskartierung	20
2.	Physiologische Charakterisierung der cob^--Mutanten	24
2.1.	Temperaturabhängiges Wachstum	25
2.2.	Absorptionsspektren der Cytochrome	27
3.	Gelelektrophorese mitochondrialer Translationsprodukte	29
3.1.	Mutationen in kodierenden Sequenzen	30
3.1.1.	Muster der mitochondrialen Translationsprodukte	30

Inhaltsverzeichnis, Fortsetzung

		Seite
3.1.2.	Immunologischer Nachweis Apocytochrom *b*-verwandter Peptide	34
3.2.	Mutationen in *nicht*-Cytochrom *b*-kodierenden Sequenzen	40
3.2.1.	Elektrophoretische Auftrennung der gesamten mitochondrialen Proteine	40
3.2.2.	Immunreaktion der Intronmutanten	43
3.2.3.	Intron-kodierte Peptide	47
4.	Doppel-Mutanten-cob^-_x x cob^-_y	52
4.1.	Kombination von zwei cob^--Mutanten aus Exons	53
4.2.	Doppel-Mutanten-cob^-_x x cob^-_y aus Exon · Intron	53
4.3.	Kombination von zwei Intron-Mutanten	56
D.	Diskussion	58
1.	Die COB-Region enthält das Strukturgen für Apocytochrom *b*	58
2.	Translation von Intron-Sequenzen des Mosaikgenes COB	64
E.	Zusammenfassung	74
F.	Literaturverzeichnis	76

A. Einleitung

Das Mitochondion ist ein teil-autonomes genetisches System in Zellen der Eukaryonten. Seine Syntheseleistung beschränkt sich auf wenige Proteine, die in ihrer Mehrzahl am Aufbau der Multienzymkomplexe der inneren mitochondialen Membran beteiligt sind (Borst 1972; Borst und Grivell 1978; Tzagoloff et al.1973 und 1979; Schatz und Mason 1974). Der genetische und biochemische Nachweis der Kodierung in der mtDNS wurde bisher für die Untereinheiten I, II und III der Cytochrom c Oxidase (Cabral et al. 1978; Mahler et al. 1977; Weiss-Brummer et al. 1979; Tzagoloff et al.1980), die Untereinheit 9 der Oligomycin-sensitiven ATPase (Wachter et al. 1977; Sebald et al. 1977) und Apocytochrom b des bc_1-Komplexes (QH_2-Cytochrom c Reduktase, diese Arbeit) erbracht.

Bei der Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae, dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Organismus, beträgt der Anteil in den Mitochondrien synthetisierter Polypeptide ca. 10 % des Proteins dieser Organelle; der Hauptanteil von ca. 90 % wird an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert und dann in die Mitochondrien transportiert (Schweyen und Kaudewitz 1970).

Es war naheliegend, die mtDNS als Kodierungsort mitochondrial synthetisierter Proteine anzusehen. Beweise für diesen Zusammenhang konnten jedoch erst mit Hilfe verschiedener mitochondrialer, atmungsdefekter Mutanten erbracht werden. Dabei handelt es sich um

a) Rho^- Mutationen, bei denen große Teile des Genoms deletiert sind (Goldring et al. 1970; Nagley und Linnane 1970; Faye et al. 1973; Deutsch et al. 1974), keine mitochondriale Proteinsynthese und damit keine Funktionen der Atmung und oxidativen Phosphorylierung mehr möglich sind.

b) Mutationen, die Resistenz gegen Hemmstoffe der Proteinbiosynthese oder Energiegewinnung bedingen (Thomas und Wilkie 1968; Avner et al.1973; Kutzleb et al. 1973).

c) mit$^-$-Mutationen, meist Punktmutationen oder Deletionen kleineren Ausmaßes in Genen mitochondrialer Proteine, ohne Beeinträchtigung der mitochondrialen Proteinsynthese (Handwerker et al. 1973; Tzagoloff et al. 1975 b; Kotylak und Slonimski 1976; Schweyen et al. 1977).
Die Mutationsorte sind mittlerweile auf einer zirkulären Genkarte des Mitochondrions lokalisiert worden. Unter Verwendung von rho$^-$-Deletionsmutanten in Kreuzungen mit Resistenz- und mit$^-$-Mutanten konnte eine rasche Erstellung der genetischen (Schweyen et al. 1978; Slonimski et al. 1978 a) als auch der physischen Karte (Van Ommen und Groot 1977; Rabinowitz et al. 1976) erfolgen.

In Abbildung 1 sind einige der bekannten Marker und ihre relative Lage zueinander auf der ringförmigen mtDNS der Gesamtlänge 25 µm (ca. 75 000 bp je nach Hefestamm etwas unterschiedlich) aufgeführt. Darin fallen zwei große DNS-Bereiche auf, einer als OXI 3 bezeichnet, der andere als COB, entsprechend BOX in anderen Publikationen. Mit$^-$-Mutanten, deren Mutationsorte in diesem COB-Bereich kartiert wurden zeigen spektroskopisch keine Adsorptionsbande von Cytochrom b mehr oder haben zusätzlich noch diejenige von Cytochrom aa_3 verloren (Tzagoloff et al. 1975 a; Slonimski und Tzagoloff 1976; Tzagoloff et al. 1976; Pajot et al. 1976). Beim Auftrennen der markierten mitochondrialen Proteine fehlt im Autoradiogramm der Gelektrophorese eine Bande vom MG etwa 30 000. Die Autoren vermuteten daher, daß dieses Polypeptid dem Apocytochrom b des bc_1-Komplexes der Atmungskette (QH_2-Cytochrom c Reduktase) entspricht. Der gesamte Bereich der mtDNS, in dem solche cob$^-$-Mutanten auftraten, wurde als COB-Region bezeichnet.

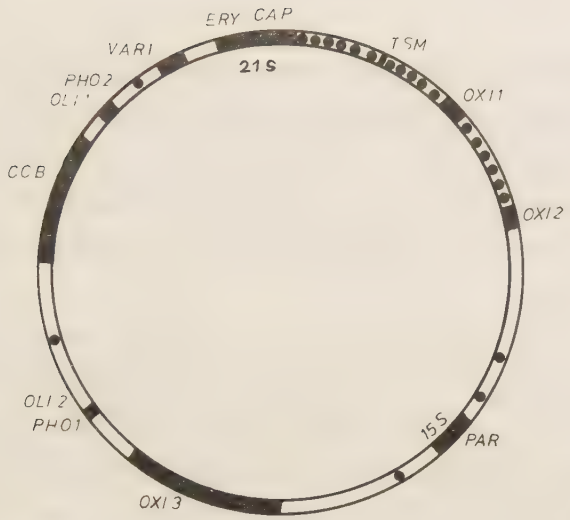


Abb. 1: Mitochondriales Genom von Saccharomyces cerevisiae als zirkuläre Karte.
Kombination aus genetischen und physischen Daten von Schweyen et al. 1978 und van Ommen und Groot 1977: Eingetragen sind die Antibiotika-Resistenz-Loci für Erythromycin (ERY), Chloramphenicol (CAP), Paronomycin (PAR) (Kutzleb et al. 1973), Oligomycin (OLI2), PHO 1,2, Mutationen der Oligomycin-sensitiven ATPase und OLI1, eine Mutation in Untereinheit 9 der Oligomycin-sensitiven ATPase mit einem MG von etwa 8000 (Sebald et al. 1977). TSM bezeichnet eine Temperatursensibilität der Gesamtgenomstabilität (Bandlow und Schweyen 1975); OXI1 entspricht der DNS-Sequenz für die Information zur Bildung der Untereinheit II der Cytochrom c Oxidase, MG 32 000 (Cabral et al. 1978); OXI2 codiert die Untereinheit III der Cytochrom c Oxidase, MG 22 000 (Mahler et al. 1977; Weiss-Brummer et al. 1979); in der OXI3 Region wird das Strukturgen für Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase MG 40 000, vermutet (Grivell und Moorman 1977). An der VAR1-Region wird ein je nach Stamm variables Protein, MG um 43 000, bisher unbekannter Funktion abgelesen (Groot et al. 1978). COB ist als Genregion die für die Synthese von Cytochrom b verantwortlich. Außerdem sind die Loci der 15S rRNS und der 21S rRNS, sowie als unbeschriftete Punkte die Verteilung von 4S tRNS-Arten über das Genom angegeben.

Die Mutationsorte verteilen sich auf eine Sequenz von 5 000 bp. Sie ist sehr viel größer als für ein Protein vom MG 30 000 (bestimmt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) zu erwarten wäre. Dies wurde von Claisse und Mitarbeitern (1977) als ein erster Hinweis auf die komplexe Organisation der COB-Region angesehen.

Theoretisch sind mehrere Modelle zur Erklärung der Länge der COB Region und der in ihr gespeicherten Erbinformation denkbar:

1. Der $\underline{bc}_1$ Komplex der Atmungskette enthält nicht nur ein sondern zwei (Weiss und Ziganke 1974, bei Neurospora crassa) oder gar drei Apocytochrom $\underline{b}$ gleichen Molekulargewichts - bei vielleicht geringfügig geänderter Aminosäurezusammensetzung - aber verschiedener Absorptionsmaxima, (Cytochrom $\underline{b}_T$ = cyt $\underline{b}_{566}$ und Cytochrom $\underline{b}_K$ = cyt $\underline{b}_{562}$) die alle an der COB Region in einen polycistronischen Messenger transkribiert und an mitochondrialen Ribosomen translatiert werden (Claisse et al. 1977; Colson und Slonimski 1977). Zwischen den einzelnen Strukturgenen postulierten die Autoren Bereiche mit regulatorischen Funktionen.
2. Vor dem eigentlichen Locus für das Strukturgen des Cytochroms $\underline{b}$ befinden sich lange "leader"-Sequenzen, die nicht transkribiert oder translatiert werden, sondern als regulatorische Abschnitte der Synthese oder als Akzeptor von Repressoren dienen (Tzagoloff 1976).
3. Außer Cytochrom $\underline{b}$ sind weitere Proteine in der COB-Region festgelegt, da bei vielen mit$^-$-Mutanten in diesem Bereich gleichzeitig ein Ausfall von Cytochrom $\underline{a}.\underline{a}_3$ im Spektrum beobachtet wurde (Pajot et al. 1977).
4. Die COB-Region besteht aus mehreren Strukturgenanteilen im Sinne eines "mosaik" oder "split" Genes.

Durch die Analyse der mitochondrialen Translationsprodukte von Mutanten aus verschiedenen Bereichen der COB-Region konnten Slonimski et al. 1978 b, im Sinne von Annahme 4 wahrscheinlich machen, daß nur ein Cytochrom b in der betreffenden Region kartiert ist und daß das Cytochrom b Gen (COB oder BOX) mosaik ist.

In einer analog der klassischen Co-Linearitätsanalyse durchgeführten systematischen Untersuchung von 36 Mutanten zeigten schließlich Haid et al. 1979 und Haid (1979), daß 1. ein Teil der cob$^-$-Mutationen frühzeitge Termination des Apocytochrom b Polypeptids bedingen, also wahrscheinlich vom non-sense oder frame-shift Typ sind; 2. diese Mutationen in mindestens drei voneinander entfert liegenden Teilsequenzen der COB-Region derart kartieren, daß die Lage der Mutationsorte mit der Verkürzung des Polypeptides im Sinne einer Co-Linearität korreliert. Daraus schließen die Autoren, daß die Information für die Aminosäuresequenz des Cytochrom b Apoproteins in mindestens drei Teilsequenzen oder Exons eines Mosaikgenes niedergelegt sind. In den dazwischen liegenden Sequenzen, den Introns, konnten ebenfalls Mutationen lokalisiert werden. Diese verändern noch stärker als die der Exon-Mutanten das Muster mitochondrial synthetisierter Proteine und deuten auf Defekte in der Transkript-Reifung oder ähnliche Störungen der Expression des Apocytochrom b Genes hin.

Eine Bestätigung der Mosaik-Organisation der COB (oder BOX) Region wurde von Van Ommen et al. 1979, durch elektronische Analyse von Hybriden zwischen mRNS der COB-Region und DNS der COB-Region nach Auftrennung der Restriktionsfragmente geliefert. Die DNS läßt sich nur nach Ausbildung mehrerer ungepaarter Schleifen mit der mRNS hybridisieren.

Die vertiefte Untersuchung der Organisation und des Kodierungsgehaltes der COB-Region, wie sie hier vorliegt, erschien aus folgenden Gründen von Interesse:

1. Die COB-Region war zu Beginn der Untersuchungen das einzige Beispiel eines Split-Genes im Genom einer Zellorganelle, also einem Genom, daß in seiner Organisation dem der Prokaryonten ähnelt.

2. Mutationen in Exons und Introns des gleichen Mosaik-Genes waren in keinem anderen System verfügbar. Ihre Analyse versprach vor allem Fragen nach der Expression von Split-Genen und nach der Bedeutung der Introns zu beantworten. Daraus ergab sich für die beabsichtigten, im Folgenden dargestellten Untersuchungen eine doppelte Aufgabe:

1. Durch die Analyse einer größeren Anzahl von cob^--Mutanten, die zunächst genetisch zu kartieren waren, sollte die Organisation der COB-Region in Exons und Introns weiter erhellt werden. Insbesondere war zu prüfen, ob die Exonbereiche durch eine dichte Aufeinanderfolge von Mutationen klarer abgegrenzt werden können. Die Möglichkeit, Antikörper gegen Apocytochrom b einsetzen zu können, versprach dabei einen sehr empfindlichen Nachweis von Apocytochrom b Fragmenten, die zum Teil nur in geringen Mengen synthetisiert werden.

2. Die Hauptaufgabe war die Charakterisierung der Intronmutanten. Neben physiologisch-phänotypischen Untersuchungen war die Wirkung auf das Muster mitochondrial synthetisierter Produkte zu untersuchen. Die große Zahl verfügbarer Mutanten und die im Vergleich zu Haid et al.(1979) weit besser auflösende Technik des immunologischen Nachweises mitochondrialer Proteine ließ erwarten, daß erstmals eine Systematisierung der durch Intronmutationen beding-

ten Wirkungen zu erreichen sei und daß daraus Rückschlüsse auf die Funktion des Introns selbst möglich werde.

B. Material und Methoden

1. Nomenklatur und Abkürzungen

1.1. genetische Begriffe

mit^-	Mutation in einem mitochondrialen Gen, z. B. Cytochrom b (= cob^-)
rho^-	Makro-Deletion der mtDNS, zurückbehaltene Teile der mtDNS werden genetisch stabil vererbt; mitochondriale Proteinsynthese fehlt.
rho^o	vollständiger Verlust der mtDNS
WT	Wildtyp, entspricht mit^+ Situation der mtDNS

1.2. Abkürzungen

box	Mutanten, denen spektroskopisch Cytochrom b und Cytochrom c Oxidase fehlt
bp	Basen-Paare
CAP	Chloramphenicol
CHX	Cycloheximid
cob	Cytochrom b-Genort in der mtDNS
cpm	Zerfälle pro Minute
d	Dalton, Molekulargewichtseinheit
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
IVS	intervenierende Sequenz oder Intron
kd	Kilo-Dalton
MG	Molekulargewicht, nach Wanderungsgeschwindigkeit im SDS-Gel bestimmt
mRNS	Messenger Ribonukleinsäure
mtDNS	mitochondriale DNS
OXI	Cytochrom c Oxidase Genorte

PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
TMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
UE	Untereinheit

2. Stämme

Die als Ausgangsstämme zur Isolierung von rho^--Deletionsmutanten und mit^--Mutanten der COB-Region verwendeten Hefestämme, sowie deren Kreuzungspartner sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die rho^--Klone, denen große Teile des mitochondrialen Genoms verloren gegangen sind, wurden wie bei Slonimski und Tzagoloff (1976) und Backhaus et al.(1978) beschrieben, aus den Stämmen Kl 14-4A, RM590-9D, RM591-1D, RM 511-4A, PI1 oder RD1 durch Zugabe von $MnCl_2$ erhalten und spontan weiter subkloniert (Schweyen et al. 1977; 1978). Diese Subklone werden mit einem Buchstaben und einer Zahl im Anschluß an die erste Bezeichnung benannt.

Die cob-Mutanten entstanden durch Behandlung des Stammes 777-3A mit $MnCl_2$ oder Nitrosoguanidin in München (Schweyen et al. 1978) Gif-sur-Yvette oder Warschau (Claisse et al. 1977) und beginnen mit einem M, G oder W, gefolgt von ein bis vier Zahlen; die der Columbus-Bloomington-Sammlung (Alexander et al. 1979) beginnen mit C und sind vom Stamm ID41-6/161 abgeleitet; die zwei verwendeten Mutanten von Tzagoloff (New York) vom Stamm D271-10B. Diese beiden zeichnen sich durch ein langsamer wanderndes VAR-Protein im SDS-Polyacrylamidgelsystem aus (Butow et al. 1977).

Stämme, die gleichzeitig zwei mit^--Mutationen der COB-Region enthalten (cob^-_x . cob^-_y), wurden nach Umkreuzen eines Stammes

Tabelle 1: Verwendete Stämme

Stamm	Genotyp		Bemerkung	Referenz
	nuklear	mitochondrial		
777-3A	α, ade1,op1	rho^+	"Wildtyp"-Kontrolle für COB-Mutanten	Kotylak und Slonimski (1976)
M101bisM7871	α, ade1,op1	rho^+, cob^-	mitochondriale Mutanten	in München isoliert
G55bisG5091	α, ade1,op1	rho^+,cob^-	von 777-3A	in Gif-sur-Yvette isoliert
W19bisW300	α, ade1,op1	rho^+, cob^-		in Warschau isoliert
ID41-6/161	a, ade, lys	rho^+	Ausgangsstamm für COB-	Alexander et al.(1979)
C15	a, ade, lys	rho^+, cob^-	Mutanten der Serie C	
IC8/AA1	a,leu1,kar1-1	rho^0	herstellen von Stämmen mit 2 Mutationen in COB	Lancashire und Mattoon (1979)
M7-40,M7-101	α	rho^+, cob^-	von D273-10B isolierte cob^--Mutanten	Slonimski und Tzagoloff (1976)
KL14-4A	a,his1,trp2	rho^0	zum Herstellen von OP^+ cob^--Nachkommen der cob^--Mutanten	Haid et al. (1979)
RM590-9D	a,trp1	rho^0		
IL993-5C	α,ilv5	rho^0	Kreuzen mit Doppel-cob^- zur Markierung	Dujon et al. (1976)
KL14-4A	a,his1,trp2 1,par^r-454	rho^+,cap^r-321,oli^r-1	zum Erzeugen von rho^--Klonen der Serien MM... AC, AD, AH, BA, BB, BC, BD, BE, BG, dD, E, i, M, P, PL, RG	Schweyen et al. (1978) und Kotylak und Slonimski (1977)
RM590-9D	a, trp1	rho^+,cap^r-321,ery^r-221, oli^r1-1,ana^r-101,par-454		
RM511-4A	a,ura1,trp1	rho^+,ery^r-221,oli^r-2-144, par^r-454		

777-3A α cob^-_y x IC8/AA1 a kar 1 cob^-_x hergestellt. Letzterer wurde konstruiert durch die Kreuzung von Stamm 777-3A α cob^-_x mit Stamm IC8/AA1 a kar 1 rho^o, der Cytoduktion zuläßt (Lancashire und Mattoon, 1979).

Für die Überlassung der Stämme sei allen erwähnten Wissenschaftlern und Instituten herzlich gedankt.

3. Medien und Feinchemikalien

YPD-Medium

Yeastrextrakt	10 g	Glukose	30 g
Agar (Difco)	15 g	H_2O dest.ad.	1 l

Glukose wird nach dem Autoklavieren steril zugegeben.

YPGal-Medium

wie YPD-Medium statt Glukose wird Galaktose zugegeben.

YPG-Medium

wie YPD-Medium, statt Glukose werden 30 ml Glycerin zugegeben.

YNB-Medium (Minimalmedium)

Difco Yeast Nitrogen Base	7 g	Glukose	30 g
Agar (Difco)	20 g	H_2O dest ad.	1 l

Acetat-Medium (Sporulation)

Natriumacetat	4 g	
Agar (Difco)	15 g	H_2O dest. ad 1 l

Flüssigmedien

Als Flüssigmedien werden die beschriebenen Medien ohne Zusatz von Agar verwendet.

LSM-Medien (low sulfate medium)

Stammlösungen

Salze	$(NH_4)\ H_2PO_4$	60 g	Spurenelemente	Borsäure	500 mg
	MgCI	1,9 g		$CaSO_4$	40 mg
	NH_4Cl	16,2 g		$MnSO_4$	400 mg
	KH_2PO_4	10 g		KJ	100 mg
	NaCl	1 g		Na_2MoO_4	200 mg
	CaCl	1 g		$ZnSO_4$	400 mg
	H_2O dest.	900 ml		H_2O dest. ad 1 l	

Vitamine	Ca-pantothenat	80 mg	Inositol-	Mesoinosit.	200 g
	Thiamin-HCl	80 mg	Lösung		
	Pyridoxin	80 mg		H_2O dest. ad	1 l
	Nicotinsäure	20 mg			
	Biotin	0,8 mg	$FeCl_3$-Lösung	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	200 mg
	H_2O dest. ad.	200 ml		H_2O dest. ad	1 l

Zur Herstellung von LSM werden die autoklavierten Stammlösungen wie folgt gemischt:

Salze	90 ml	Inositol	1 ml
Spurenelemente	1 ml	$FeCl_3$-Lösung	1 ml
Vitamine	5 ml	H_2O dest. ad	1 l

PBS-Puffer zur Immunologie

Na_2HPO_4	10 mM	
NaCl	150 mM	pH 7,2

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von der Firma Merk, Darmstadt bezogen.

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Biotin	Cal. Biochem. Los Angeles, USA
CAP	Bayer, Leverkusen
Casamino Acids	Difco, Detroit, USA
CHX	Sigma, St. Louis USA
Dithoithreitol	Sigma, St. Louis USA
EDTA	Baker, Deventer, Holland
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ficin	Sigma, St. Louis USA
Helicase	Boehringer Mannheim
N.N'Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
Nitrosoguanidin	EGA-Chemie, Steinheim
Polyacrylamid	BDH Ltd, Poole England
SDS	Serva, Heidelberg
$^{35}SO_4^{2-}$	Amersham-Buchler, Braunschweig
TMED	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg

4. Methoden

4.1. Kartierung der COB-Mutationsorte

4.1.1. mit^- x mit^- Rekombinationsanalyse

Jeweils zwei COB-Stämme (cob^-_{y} a und cob^-_{x} α) wurden auf YNB-Platten gekreuzt, die Mischkultur (10^3-10^4 Zygoten) nach 5 Stunden Inkubation bei 30°C in flüssiges Minimalmedium transferiert und etwa 10 Zellgenerationen weiter gezüchtet. Durch Plattieren auf YPG-Medium, das 0,1 % Glukose enthielt, konnte die Relation atmungskompetenter Zellen (Rekombinanten = große Kolonien) zu atmungsdefekten Zellen (kleine Kolonien) ermittelt werden.

4.1.2. mit^- x rho^- Deletionskartierung

cob^--Mutanten wurden auf YNB-Platten mit selektierten rho^- Stämmen gekreuzt, die nur Teile der gesamten COB-Region zurückbehalten hatten. Konnten die Nachkommen auf YPG-Platten wachsen, d. h. traten Wildtyp-Rekombinanten auf, so wurde auf gemeinsame DNS-Anteile geschlossen.

4.2. Wachstumsverhalten

a) Alle naploiden cob^- Stämme vom Paarungstyp α wurden mit dem Stamm K114-4A rho^0 a auf YNB-Platten gekreuzt. Die diploiden Kulturen wurden auf YPG-Platten überstempelt und bei 19°C, 28°C oder 35°C bebrütet.

b) Einige Stämme wurden zusätzlich in YPG-Flüssigmedium geimpft und das Wachstum durch Zunahme der optischen Dichte bei 578 nm Wellenlänge in einem Eppendorf Photometer bestimmt.

4.3. Cytochromspektren

Zellen von cob$^-$-Mutanten wurden auf YPGal-Platten ausgestrichen und bei 19°C, 28°C oder 35°C zwei bis vier Tage lang bebrütet. Sie wurden in 0,6 ml Glycerin (50%) suspendiert, mit Natrium-Dithionit reduziert, in eine Aluminium-Plexiglas-Küvette gefüllt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Cytochromspektren wurden in einem modifizierten Shimadzu-UV-210A-Spektrophotometer (Lang et al. in Vorbereitung) bei einer Wellenlänge von 610 bis 500 nm aufgenommen.

4.4. Radioaktive Markierung mitochondrialer Translationsprodukte

Die meisten der untersuchten cob$^-$-Mutanten sind vom Wildtypstamm 777-3A abgeleitet, der die Kernmutation op1 trägt (Kotylak und Slonimski 1977). Da in diesem Stamm die Markierung der mitochondrialen Translationsprodukte in vivo beeinträchtigt ist, (Claisse et al. 1978; Haid et al. 1979), wurden die Mutanten zunächst mit einem rho°-Stamm, der aus den Wildtypstämmen K114-4A oder RM590-9D durch Behandlung mit Ethidiumbromid gewonnen wurde, gekreuzt. Diese Stämme enthalten das dominante OP1 Wildtyp-Allel; die nach der Kreuzung gebildeten diploiden Zellen lassen sich normal markieren.
Die Züchtung der Zellen in YPD, Aushungern in Gegenwart von CAP (4 mg/ml), waschen mit LSM, Markierung mit $^{35}SO_4^{2-}$ (200 µCi/ml) in Gegenwart von CHX (200 µg/ml) erfolgte nach der Methode von Douglas und Butow, (1976). Dabei wurde dem LSM 0,3 % Glukose zugesetzt und die Markierungszeit je nach Temperatur variiert: bei 19°C 2 Stunden, bei 28°C 1 Stunde, bei 35°C 50 Minuten. Die Einwirkungszeit des "Chase"-Mediums wurde um eine Stunde bei 0°C verlängert (A. Haid, 1979).

Die gleichzeitige Gewinnung der Mitochondrien aus vielen parallelen Markierungsansätzen erfolgte mit Hilfe von Glasperlen und fraktionierter Zentrifugation nach der Methode von Needleman und Tzagoloff (1975).

4.5. SDS-Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese

Die in H_2O suspendierten Mitochondrien wurden durch 2 Minuten Kochen in Dissoziationspuffer (SDS-Endkonzentration 5%) gelöst und in die Taschen des Sammelgels (Länge 4 cm) eines SDS-Plattengelsystems aufgetragen. Es wurde das von Laemmli (1970) beschriebene, diskontinuierliche Puffersystem verwendet. Die Trenngele (Dicke 1 mm, Länge ca. 15 cm) wiesen einen exponentiellen Gradienten der Acrylamidkonzentration von 10 % (oben) bis 15 % (unten) auf (Douglas und Butow 1976). Die Auftrennung der Proteine erfolgte über Nacht bei einer Spannung von 70 V. Die Gele wurden entweder bei gleichzeitiger Verwendung von Eichproteinen mit 10 % Trichloressigsäure, 20 % Methanol fixiert, mit 0,25 % Coomassie-Blau G-250 gefärbt und mit 7 % Essigsäure entfärbt oder sofort in einem Geltrockner auf Filterpapier getrocknet. Autoradiogramme entstanden durch verschieden lange Exposition von Kodak Regulix BB-5 Röntgenfilmen auf den trockenen Gelen.

4.6. Eindimensionale Peptidkartierung

^{35}S-markierte Mitochondrien wurden auf 1,6 mm dicke Plattengele aufgetragen, deren Sammelgel keine Taschen enthielt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele kurz angefärbt und entfärbt (siehe 4.5.). Seitlich wurde ein Streifen des Gels abgeschnitten, getrocknet und autoradiographiert, um Apocytochrom b oder ein neues Protein der Mutanten in Relation zu den angefärbten

Banden identifizieren zu können. Das interessierende Protein wurde aus den Gelen ausgeschnitten, wobei die gefärbten Banden als Leitlinien dienten. Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden mit 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,1 % SDS; 5 MM DTT aequilibriert und in die Taschen eines zweiten Plattengels (Dicke 2 mm) überführt. Protease wurde in verschiedenen Konzentrationen in die Geltaschen zupipettiert und die nach der begrenzten Proteolyse erzeugten Peptide nach der Methode von Cleveland et al. (1977) elektrophoretisch getrennt. Die Gele wurden nach Beendigung des Laufes getrocknet und autoradiographiert.

4.7. Immunologische Methoden

4.7.1. Immunpräzipitation

Mit ^{35}S-markierte Mitochondrien (5-10 µl, 2-5 x 10^5cpm) wurden in 30 µl PBS + PMSF (1 mM) suspendiert, mit 2 % SDS (Endkonzentration) versetzt und 10 Minuten bei 56°C geschüttelt, um die mitochondrialen Proteine in Lösung zu bringen. Anschließend wurde Triton X-100 zur Endkonzentration 5 % zugegeben, wie von Maccechini et al. (1979) vorgeschlagen. Die Lösung wurde zentrifugiert und der Überstand mit 5 µl Antiserum gegen Apocytochrom b oder Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann wurden 0,1 ml 10 % (w/v) fixierte und frisch mit PBS + 1 % Triton X-100 gewaschene Staphylococcus aureus Zellen zugegeben und die Suspension eine halbe Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt (Kessler, 1976). Die Zellen wurden 3 Mal mit PBS + 1 % Triton X-100, 3 Mal mit PBS zum Entfernen des Detergenz gewaschen. Zum Ablösen der präzipitierten Proteine wurden die Proben 30 Minuten bei 56°C in Reduzierpuffer (5% SDS) erhitzt, abzentrifugiert und der Überstand in SDS-Polyacrylamidgradientengelen aufgetrennt.

4.7.2. Immun-Replika

Nach der Methode von Showe et al. (1976) und Cabral et al. (1978) wurden Agarosegele mit Antiserum gegen Apocytochrom b versetzt und über Nacht auf die in SDS-Polyacrylamidgradienten-gelen getrennten, ^{35}S-markierten Proteine gelegt. Anschließend wurde das Agarosegel gewaschen, getrocknet und autoradiographiert.

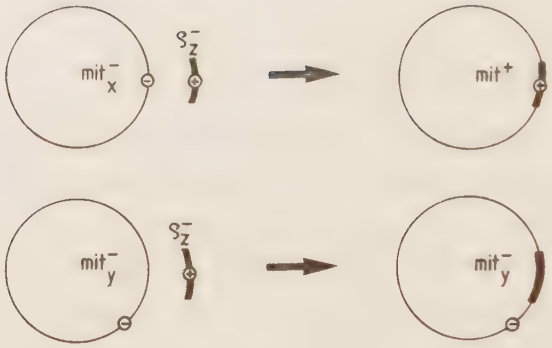
C. Ergebnisse

1. Genetische Karte der COB-Region

Die bisnerigen Aussagen über den Codierungsgehalt der COB-Region beruhten auf der Analyse einer geringen Anzahl von mitochondrialen Mutanten (Mahler et al. 1977; Kotylak und Slonimski 1977; Haid et al. 1979). Bei der inzwischen bekannten Komplexität der Region ergaben sich aus der geringen Anzahl Widersprüche, die nur durch die hier biochemisch untersuchte große Zahl von cob^--Mutanten nach durchgeführter Feinkartierung aufgelöst werden können.

1.1. rho^--Deletionskartierung

Die Bestimmung der linearen Aufeinanderfolge der Mutationsorte erfolgte zunächst durch rho^--Deletionskartierung, eine Methode, die schon zuvor in dieser und anderen Regionen des mitochondrialen Genoms erfolgreich angewendet wurde (Kotylak und Slonimski 1977; Schweyen et al. 1977; Tzagoloff et al. 1976). Alle cob^--Mutanten wurden mit den von S. Mathews (persönliche Mitteilung) vorcharakterisierten 43 rho^--Klonen (Ausgangsstämme dazu siehe Material und Methoden; Abb. 2) gekreuzt. Die wiedererlangte Wachstumsfähigkeit auf nicht vergärbarem Substrat (YPG-Platten) wurde qualitativ bestimmt und als Beweis für die Rekonstitution des mit^+ Zustandes durch Rekombination zwischen mit^- und rho^- nach folgendem Schema gewertet:



Entsprechend der Fähigkeit von rho$^-$-Klonen nach Kreuzung mit cob$^-$-Mutanten in einigen, aber nicht allen Fällen Wildtyp-Wachstum wiederherzustellen, konnte die COB-Region in 38 aufeinanderfolgende Kluster von Mutationsorten eingeteilt werden. In Abb. 1 ist jeweils ein Vertreter eines Klusters (mit der verwendeten Methode nicht weiter auflösbare mutationstragende Abschnitte der DNS) im oberen Teil des Bildes angegeben. Die zusätzlichen, zu einem Kluster zählenden Mutanten sind in Tabelle 1 aufgeführt. Mit weiteren, nach anderen Methoden und Kriterien ausgesuchten rho$^-$-Klonen wurde von Slonimski et al. 1978 a, ein entsprechendes Ergebnis erzielt. Interne Deletionen in der mtDNS der rho$^-$ Klone konnten nicht festgestellt werden. Dies wurde durch physische Kartierung einiger der verwendeten rho$^-$klone bestätigt (Grosch et al. 1981). Die Anordnung der mit dieser Kartierungsmethode bestimmten Mutationsorte ergibt daher mit großer Wahrscheinlichkeit deren lineare Aufeinanderfolge in der Wildtyp-DNS.

Einen Hinweis auf die Abstände zwischen Klustern gibt die Häufigkeit der gefundenen rho^--Klone, die zwischen zwei Klustern zu trennen vermögen: Je mehr trennende rho^--Klone gefunden werden, desto weiter liegen die betrachteten Mutationen voneinander entfernt (Schweyen et al. 1977). Die intensive Analyse von rho^--Klonen, die nicht alle in Abb. 2 aufgenommen werden konnten, führte zu dem Ergebnis, daß zwischen den Klustern 10 und 11, 23 und 24 und 30 und 31 beträchtliche physische Abstände liegen müssen.

1.2. cob^-_x x cob^-_y Rekombinationen

Zur Abschätzung der Reihenfolge von Mutationsorten innerhalb von Klustern, denen viele Mutanten angehören und um eine eher quantitative Bestimmung der Abstände der Mutationsorte voneinander zu erhalten, wurde mit einigen cob^--Mutanten eine Rekombinationskartierung durchgeführt. Die vom Stamm 777-3A **a** abgeleiteten cob^--Mutanten wurden durch Kreuzung mit dem Stamm Kl14-4A a rho^o in Kl14-4A a cob^- Mutanten überführt. Anschließend konnten die cob^- Mutanten gegeneinander gekreuzt werden (777-3A **a** cob^-_x x Kl14-4A a cob^-_y). Der Prozentanteil atmender Rekombinanten, die auf Glyzerinmedium wachsen, wurde unter den diploiden Nachkommen bestimmt. Die maximale Rekombinationshäufigkeit an atmenden Rekombinanten beträgt ca. 12 % (Dujon et al. 1974). Erreicht die Anzahl der atmenden Rekombinanten Werte > 10 %, d. h. die maximale Rekombinationsrate, so liegen die Mutationsorte dieser zwei Mutanten so weit voneinander entfernt, daß keine Kopplung zueinander mehr festzustellen ist.

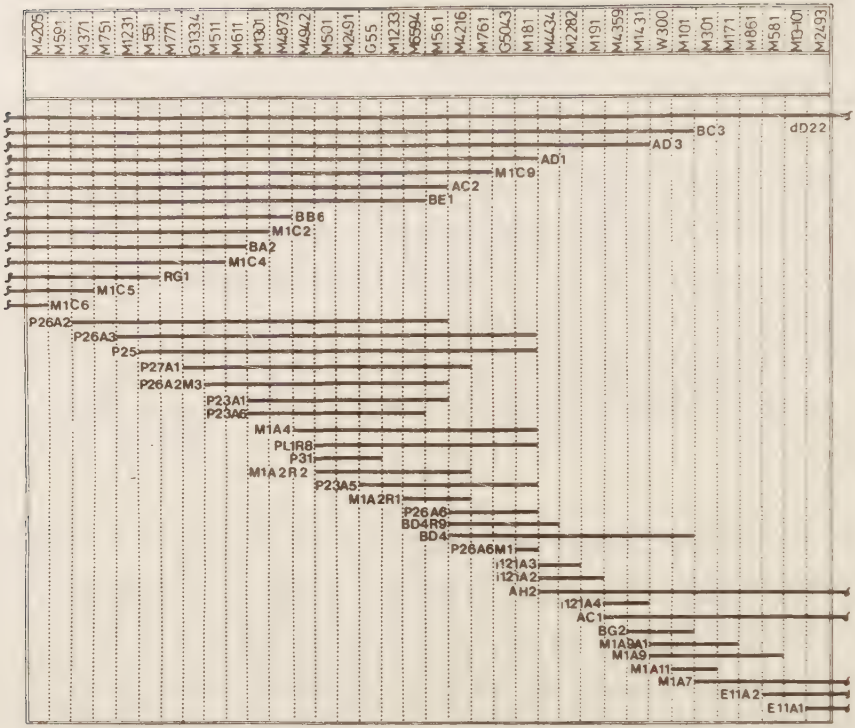


Abb. 2

Genetische Karte der COB Region, ermittelt durch Kreuzung von rho$^-$-Mutanten.

Die in rho$^-$-Mutanten zurückbehaltenen Genomanteile sind durch wagrechte Balken dargestellt. Nach Kreuzung mit bestimmten der oberhalb angegebenen cob$^-$-Mutanten (M4205 bis M2493), deren jede einem anderen Mutantenkluster angehört, vermögen sie durch Rekombination atmungsfähige Nachkommen zu bilden.
Die rho$^-$-Klone AC1, AC2, AD1, AD3, AH2, BG2, BD4 und BD4R9 sind abgeleitet vom Stamm RM591-1D, die Klone BC3 und BE1 vom Stamm RM590-9D, Klone dD22, BA2 und BB6 vom Stamm RM511-4A (Schweyen et al. 1978).
Von P.P. Slonimski (Gif-sur-Yvette) stammen die rho$^-$-Klone RG1, P26, P27, P23, PL1, P31, i121, und E11, die vom Stamm Kl14-4A abgeleitet wurden. Sie wurden für diese Arbeit weiter subkloniert; solche Subklone sind durch zusätzlichen Buchstaben + Zahl im Anschluß an die erste Benennung gekennzeichnet. Die Subklon-Serie M1... entstand spontan im Stamm Kl14-4A. Gesamtorientierung der Karte: links außerhalb OLI2, rechts OLI1 (siehe Abb. 1).

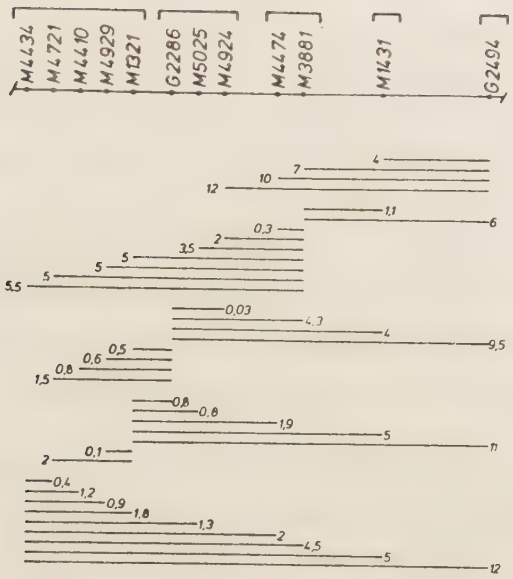


Abb. 3.

Kartierung durch mit^-_x x mit^-_y- Rekombinationsanalyse

In paarweisen Kreuzungen von mit^--Mutanten wurde die Häufigkeit der mit^+-Rekombinanten ermittelt. In Abb. 3 gibt eine Serie von horizontalen Strichen und Zahlen an deren Ende den Prozentsatz von beobachteten mit^+-Rekombinanten in Kreuzungen einer gegebenen Mutante mit einigen anderen Mutanten an. Aufgezeichnet ist ein mittlerer Teil der COB-Region (siehe Abb. 2). Die Klammern oberhalb der Mutationsorte entsprechen der Klustereinteilung durch rho^--Kartierung aus Abb. 2 bzw. Tabelle 2.

Abbildung 3 zeigt einen Teil der Ergebnisse der Rekombinationskartierung aus dem mittleren Bereich der COB-Region mit 12 Markern. Die am Ende jeder waagerechten Linie angegebenen Zahlenwerte sind Prozentangaben der Rekombinationshäufigkeit, die jeweils eine Kreuzung zwischen zwei cob^--Mutanten ergibt. Kreuzt man zwei gleiche, nur im Paarungstyp unterschiedliche cob^--Mutanten, so entstehen in den diploiden Nachkommen mit einer Häufigkeit von unter 0,001 % atmende Zellen als Rückmutanten. Mutationsorte, die nach Deletionskartierung dem gleichen Kluster zugeordnet werden (Abb. 2), erscheinen eng gekoppelt ($<$ 2 % Rekombinanten).

Innerhalb des dargestellten Teilbereiches der COB-Region läßt sich Kopplung von Mutationsort zu Mutationsort nachweisen. Nach rechts oder links von diesem betrachteten Teilbereich der COB-Region schließt sich im OLI 1 - und OLI 2 - nahen Bereich ohne Kopplung zum dargestellten mittleren Bereich jeweils ein weiterer Teilbereich der COB-Region an, in dem die Mutationsorte wieder mehr oder weniger eng gekoppelt sind; im OLI 2 - nahen Bereich wurden dazu 20 Marker untersucht, im OLI 1-nahen Bereich sechs Marker gegeneinander gekreuzt (ohne Abbildung). Die Rekombinationsanalyse der in Tabelle 2 angegebenen Mutanten ordnet diese damit drei Kopplungsgruppen zu, welche untereinander keine Kopplung zeigen. Für die weiteren Untersuchungen ist die durch rho^--Klone in Abschnitt 1.1. ermittelte Karte hinreichend genau.

Zusammenfassung:

Die COB-Region wurde durch rho^--Deletionskartierung in 36 Kluster von Mutationsorten aufgeteilt und deren Orientierung zu den benachbarten Markern OLI 1 und OLI 2 festgelegt. Die

Klust.	Mutant. Stamm	Temp. abhän. Wachs.	Cyto. c Oxi. Spek.	Gel	Anti.	Apocyt. b Spek.	Gel	Anti.	42000 Prot.	Neue Polypeptide
			UE I							
1	M4205	-	+	+	nt	-	-	nt	nt	
	M4457	-	+	+	nt	-	-	nt	nt	
	M5020	-	-	-	nt	-	-	-	-	
2	M591	-	+	+	nt	-	-	nt	nt	
	M7622	-	+	+	nt	-	+	+	w	
3	M371	cs	+	+	nt	-	(+)	+	-	
	M772	-	+	+	nt	-	-	(+)	-	
	M2499	-	-	-	-	-	-	-	-	
	M2602	-	-	(+)	nt	-	-	-	-	
	M4883	cs	+	+	nt	-	(+)	+	-	
	M6101	cs	+	+	nt	-	-	(+)	-	
4	M751	-	(+)	(+)	nt	-	-	-	-	
	M4151	-	(+)	+	nt	-	-	-	-	
	M4874	-	+	+	nt	-	-	nt	nt	
	M4577	-	+	+	+	-	-	(+)	-	8
	M631	-	+	+	+	-	(+)	+	-	9
5	M1231	-	+	+	nt	-	-	-	-	
	M1624	-	+	+	nt	-	-	(+)	-	
	M4931	-	+	+	+	-	-	(+)	-	10
6	M551	-	+	+	nt	-	-	(+)	-	
	M6821	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	G5071	-	-	(+)	+	-	-	(+)	-	10
7	M771	-	-	-	-	-	-	-	-	11
8	G1334	-	-	(+)	+	-	-	-	-	12
	M1322	-	+	+	+	-	-	-	-	12
9	511	-	(+)	(+)	+	-	-	-	-	13
	M871	-	+	+	nt	(+)	+	+	w	
	M4901	-	+	+	+	-	-	-	-	15
	M5005	-	+	+	nt	-	-	nt	nt	
10	M611	-	-	-	-	-	-	-	-	14
	G171	-	-	-	nt	-	-	-	-	14
	G5049	-	-	-	-	-	-	-	-	15
11	M1301	-	-	-	(+)	-	-	(+)	-	15
	G5064	-	-	-	(+)	-	(+)	+	-	15
12	M4873	hs/cs	-	(+)	+	-	-	(+)	-	15
13	M4942	cs	-	-	(+)	-	-	(+)	-	15 16.5
14	M501	-	-	-	-	-	-	-	-	15 17
	G5069	cs	-	-	(+)	-	-	-	-	15 18

Klust.	Mutant. Stamm	Temp. abhän. Wachs.	Cyto. c Oxidase Spek.	Gel	Anti.	Apocyt. Spek.	Gel	anti.	Prot.	Neue Polypeptide
			UE I							
20	M4216	-	+	+	+	-	-	(+)	+	15
21	M761	-	+	+	+	-	-	+	+	15
	M841	-	+	(+)	+	-	-	+	+	15
	M2011	-	+	(+)	+	-	-	(+)	+	15
22	G5043	-	-	-	-	-	-	-	+	15 16 50
23	M181	-	-	-	-	-	-	-	+	15 16 19
	M271	-	-	-	(+)	-	-	+	+	15 16 19
	M811	-	-	-	(+)	-	-	-	+	15 16 19
	M1392	-	-	(+)	+	-	-	-	(+)	15 16 19
	M4881	leaky	+	+	+	-	+	+	+	15 16 19 29
	M7793	-	-	(+)	+	-	-	-	-	15 16 19
24	M4434	-	+	+	+	-	-	-	+	16
	M521	-	+	+	nt	-	-	-	w	17
	M531	-	+	+	+	-	-	-	+	17
	M4721	-	+	+	nt	shift	+	nt	nt	
	M4410	-	+	+	nt	(+)	+	nt	nt	
	M4929	-	+	+	nt	-	-	-	w	17.5
	M1321	-	+	+	nt	-	-	-	+	17.5
25	M2282	-	+	+	nt	-	-	-	w	18
	G2286	-	+	+	nt	-	-	-	(+)	18
	M5025	-	+	+	nt	-	-	-	+	18
	C15	-	+	+	nt	-	-	nt	nt	19.5
	M4924	-	+	+	nt	-	-	-	w	19.5
26	M191	-	+	(+)	+	-	-	(+)	+	23 32
	M281	-	+	(+)	+	-	-	-	+	23 29 36 50
	M381	-	+	+	+	-	-	(+)	(+)	23 28 36
	M4458	hs	+	+	+	-	-	(+)	(+)	23 28 36
	M4474	-	+	(+)	+	-	-	-	(+)	23 28 36
	M3881	cs	+	+	+	-	-	(+)	(+)	23 28 36
	M4701	cs	+	(+)	+	-	-	(+)	-	23 28 36
	M4772	cs	+	+	+	-	-	(+)	(+)	23 28 36
	M7832	cs	+	+	+	-	(+)	+	+	23 28 36
	M4751	hs/cs	-	-	(+)	-	-	(+)	+	23 28 36 69
	M2281	hs/cs	-	-	-	-	-	(+)	(+)	23 28 36
27	M4359	hs/cs	-	-	-	-	-	(+)	+	23 12 36
	G410	-	-	-	-	-	-	(+)	+	23 12 36
	G1659	-	-	-	-	-	-	-	(+)	23 12 36
	G476	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	23 36
28	M1431	hs/cs	-	-	-	-	-	(+)	+	23 12 36
	M651	-	-	-	-	-	-	-	+	23 28 36

	M4111	-	-	-	-	-	-	-	+	15	18		
	M661	-	-	-	-	-	-	-	-	15	18	20	
	M2075	-	-	-	-	-	-	-	-	15	18	20	
	M2103	-	-	-	(+)	-	-	-	-	15	18	22	
	G5026	cs	-	-	-	-	-	-	-	15	18	23	
	G5084	cs	-	-	(+)	-	-	(+)	-	15	18	26	
	M1282	hs	-	-	(+)	-	-	(+)	+	15	18		
	G1370	-	-	-	-	-	-	-	-	15	18	32	
	M7871	-	-	-	(+)	-	-	-	-	15	18		
	M4926	hs	-	-	-	-	-	-	+	15	18	32	
	M801	-	-	-	-	-	-	-	-	15	18	33	
15	G5075	-	-	-	-	-	-	-	-	15	18		
	M2491	cs	-	-	(+)	-	-	-	-	15	18	32	
	M2573	cs	-	-	-	-	-	-	-	15	18	32	
	M4476	hs/cs	-	-	-	-	-	-	-	15	18	32	
	G5015	hs	-	-	-	-	-	-	-	15	18	43	
16	G55	-	-	-	-	-	-	-	-	15	18	33	
	M3041	hs	-	-	(+)	-	-	-	-	15	18	34	
	M7801	cs	-	-	(+)	-	-	-	-	15	18	35	
	G5006	-	-	-	-	-	-	-	-	15	18	35	
	W401	-	-	-	-	-	-	-	+	15	18		
	M5001	hs	-	-	-	-	-	-	-	15	18	35	40
	G1909	-	-	-	(+)	-	-	-	+	15	18		
17	M1233	-	-	-	-	-	-	-	-	15	18	38	
	M4218	leaky	-	-	(+)	-	-	(+)	-	15	18	39	
18	M6594	-	-	-	-	-	-	-	-	15	18	35	39
	M2022	hs/cs	-	-	(+)	-	-	-	-	15		41	
19	M561	-	-	-	-	-	-	-	+	15	18	26	
	G5046	-	-	-	-	-	-	-	+	15			

29	W300	-	-	-	-	-	-	-	+	23	28	36	
	W19	-	-	(+)	+	-	-	-	+		28	36	
	G2590	-	-	(+)	+	-	-	(+)	(+)	23	28	36	
30	M101	-	+	+	+	-	-	-	(+)	21			
	M741	-	+	+	nt	+	+	nt	nt				
	M2911	-	+	+	nt	-	-	-	w	21			
	G2494	-	+	+	nt	-	-	-	+	22			
31	M301	-	+	+	nt	-	-	-	(+)	22.5			
	M4953	-	+	+	nt	-	-	-	w	22.5			
32	M171	-	+	+	nt	-	-	-	+	23			
	M401	-	+	+	nt	-	-	-	+	23			
	M541	-	+	+	nt	-	-	-	+	23			
	M602	-	+	+	nt	-	-	-	+	23			
	M641	-	+	+	nt	-	-	-	+	23			
	M831	-	+	+	nt	-	-	-	+	23			
	M1354	-	+	+	nt	-	-	-	+	23			
	M6621	-	+	+	nt	-	-	-	w	23			
33	M861	-	+	+	nt	-	-	-	+	24			
	M4891	-	+	+	nt	-	-	(+)	w	24			
	M6102	-	+	+	nt	-	-	-	w	24			
34	M581	-	+	+	nt	-	-	-	+	25			
	M4615	hs	-	-	nt	-	+	nt	nt				
	W267	-	+	+	nt	-	-	-	w	27			
	M7-40	-	+	+	nt	-	-	-	-	28			
35	M13-101	-	+	+	nt	-	-	-	-	29			
36	M2493	-	+	+	nt	-	-	-	+	29.5			
	M4494	-	+	+	nt	-	-	-	+	30.5			

Tabelle 2: Zusammenstellung aller in der COB-Region untersuchter Mutanten-Stämme bezügl. ihres Phänotyps

Die Einteilung erfolgte in der Ordnung der durch rho$^-$ -Deletionskartierung ermittelten Kluster 1 bis 36. Temperaturabhängiges Wachstum wurde mit cs beschrieben, wenn die Stämme nicht bei 19°C wuchsen, als hs, wenn sie nicht bei 35°C wuchsen, als leaky, wenn ihnen bei allen Temperaturen geringes Wachstum möglich war. Cytochrom c Oxidase-Aktivität wurde als Peak des Cytochrom aa_3-Spektrums gewertet, im Gel wurde die UE I betrachtet, in der nächsten Spalte nach Antikörperpräzipitation. Cytochrom b wurde im Spektrum ermittelt und als Bande des MG 30 000 im SDS-Gel, bzw. nach Antikörperpräzipitation. Das 42 000 d Protein wird als neues Genprodukt der COB-Region in dieser Arbeit beschrieben. Neue Polypeptide wurden in ihrer etwaigen Größe in kd (=1000 d) angegeben, wenn sie mit Antiserum gegen Apocytochrom b reagierten, sind sie unterstrichen. nt = nicht getestet; w = Autoradiogramm zu wenig exponiert, um eine sichere Aussage zu machen.

mit^-_x x mit^-_y-Rekombinationskartierung lieferte keine, über die rho$^-$-Kartierung hinausgehende Auflösung. Beide Analysemethoden zeigen keine Widersprüche in der Aufeinanderfolge der Marker; dies schließt Rearrangements in der in rho$^-$ enthaltenen DNA weitestgehend aus. Die COB-Karte, erhalten durch rho$^-$-Kreuzungen, wird daher im Folgenden als Grundlage für die Gesetzmäßigkeiten der biochemischen Analyse der cob$^-$-Mutanten herangezogen.

2. Physiologische Charakterisierung der cob$^-$-Mutanten

Analysiert man die ersten gefundenen mitochondrial vererbten Mutanten biochemisch, so finden sich auch solche mit Defekten in den Enzymen der Cytochrom c Oxidase, der QH_2-Cytochrom c Reduktase oder in beiden Enzymen der Atmungskette gleichzeitig. Sie wurden als cob$^-$ (Tzagoloff et al. 1976) oder box$^-$ (Kotylak und Slonimski 1976) bezeichnet und von den Autoren spektroskopisch untersucht. Nachdem die Methodik der Gelelektrophorese durch SDS-Gradientenflachgele (Douglas und Butow 1976) eine erweiterte Anwendung zuließ, gelang es, die mitochondrial synthetisierten Untereinheiten I, II, III der Cytochrom c Oxidase und das vermutete Apocytochrom b voneinander zu trennen. Die Untersuchung der mitochondrialen Translationsprodukte der cob$^-$-Mutanten erbrachte, daß den meisten von ihnen Cytochrom b und einem Teil zusätzlich die Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase fehlt (Tzagoloff et al. 1976; Claisse et al. 1977; Mahler et al. 1977; Haid 1979) und statt dessen bei einigen Mutanten neue Banden im Gelmuster auftreten. Durch die im Folgenden dargestellte Untersuchung einer Vielzahl von Mutanten der COB-Region war es mög-

lich, Gesetzmäßigkeiten des Verlustes oder Neuerscheinens von Banden der Translationsmuster und deren Verwandtschaft zu bekannten Polypeptiden, sowie des Verlustes von spektroskopisch beim Wildtyp nachweisbaren Cytochromen und des Wachstumsverhaltens nachzuweisen.

2.1. Temperaturabhängiges Wachstum

Wie Kotylak und Slonimski (1977) ausgeführt haben, wurden die meisten mitochondrialen cob^--Mutanten im Stamm 777-3A induziert, um das spontane Auftreten von rho^--Klonen zu verhindern. Der Stamm trägt im Kern die Mutation op1 (rezessiv) und kann nur auf vergärbarem Substrat wachsen. Die Kombination op1 rho^- ist letal (Kováčová et al. 1968). Mutanten, deren Genome op1 rho^+ mit^- sind, können (auf vergärbarem Substrat) weiterhin wachsen. Um die Fähigkeit von Atmung und Wachstum auf nicht vergärbarem Substrat von mit^--Mutanten zu überprüfen, werden diese vorher mit einem OP^+ Stamm (dominant), der mitochondrial rho^o ist, gekreuzt. Die diploiden Zellen werden dann bei 19°C, 28°C oder 35°C auf nicht vergärbarem Substrat (YPG) gezüchtet. Die überwiegende Mehrzahl der Mutanten vermag bei keiner Temperatur zu wachsen. Einige der Mutanten können zwar bei 28°C wachsen, nicht jedoch bei 19°C (cs = Kälte sensibel, 12 Mutanten) oder 35°C (hs = Hitze sensibel, 6 Mutanten) oder bei keiner der beiden extremen Temperaturen (cs/hs 8 Mutanten), siehe Tab. 2. Zwei Mutanten wuchsen langsam bei allen Temperaturen und erwiesen sich als leaky (l). In Abb. 4 sind je ein Beispiel für das Wachstumsverhalten von Wildtyp und Temperaturabhängigkeit der Mutanten aufgezeichnet.

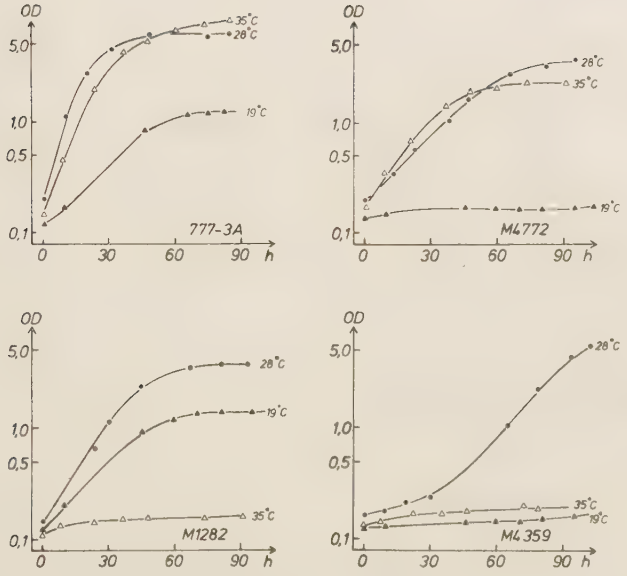


Abbildung 4

Temperaturabhängigkeit bei cob$^-$-Mutanten

Die Vermehrungsfähigkeit der Hefestämme 777-3A (Wildtyp) und der cob$^-$-Mutanten M4772, M1282 und M4359 wurde bei 19°C, 28°C und 35°C in Glycerinmedium unter aeroben Bedingungen verfolgt. Die optische Dichte (OD) wurde in einem Photometer bei 578 nm gemessen, die Zeit in Stunden (h).

●——● 28°C; ▲——▲ 19°C; △——△ 35°C

Wie aus Tabelle 2 zu ersehen ist, liegen in einigen Bereichen der COB-Region im Wachstum temperaturabhängige Mutanten signifikant gehäuft vor. Im Kluster 3 finden sich drei cs Mutationsorte; in Kluster 12, 13, 14, 15, 16, 17 und 18 alle Varianten; eine l in Kluster 23; alle Varianten wieder in Kluster 26, 27, 28 und eine hs in Kluster 34. Läßt man solche Zellen bei permissiver Temperatur wachsen, so zeigen sie Wildtyp-Charakter. Es ist daher anzunehmen, daß die Synthese einer oder mehrerer Komponente(n) der Atmungskette temperaturabhängig ist.

2.2. Absorptionsspektren der Cytochrome

Die mitochondrialen Cytochrome der Wildtyp-Hefezellen weisen bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs Absorptionslinien bei folgenden Wellenlängen auf:

Cytochrom		
	$\underline{c}$	547 nm
	$\underline{c}_1$	553 nm
	$\underline{b}$	558,5 nm
	$\underline{aa}_3$	602 nm.

Fast allen cob^--Mutanten fehlt die Cytochrom $\underline{b}$ Absorptionslinie bei 558,5 nm (Abb. 5A und Tabelle 2). Bei der Mutante M4721 ist das Absorptionsmaximum um 1,5 nm zum längerwelligen Bereich nach 560 nm verschoben (Abb. 5B). Diese Abweichung deutet auf eine Änderung der Struktur des Häm-bindenden Proteins durch Aminosäureaustausch infolge der Mutation hin.
In der Umgebung des Mutationsortes M4721 ist deshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Strukturgenbereich für Cytochrom $\underline{b}$ anzunehmen. Etwa einem Drittel der cob^--Mutanten fehlt außerdem die Absorptionsbande für Cytochrom $\underline{aa}_3$ (Abb. 5A, Tabelle 2). Sie gleichen darin den von Pajot et al. (1976) beschriebenen box-

Abbildung 5A

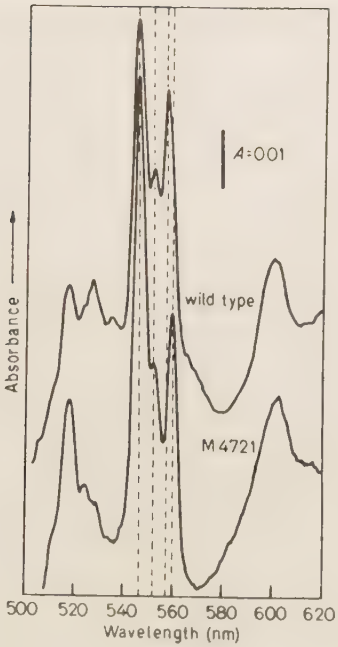


Abbildung 5B

Tieftemperaturabsorptionsspektren von Zellen des Wildtyps und der Mutanten M4931 und M4476 (A) und Wildtyp und Mutante M4721 (B).

Die Hefestämme wurden mit dem Stamm K114-4A rho^{o} gekreuzt und die Diploiden auf YPGal-Platten bei 28^{o}C gezüchtet. Die Absorptionsmuster wurden an ganzen Zellen in flüssigem Stickstoff aufgenommen. Die Mutante M4476 ist vom Phänotyp cs/hs, ihre Zellen wurden deshalb bei 35^{o}C bebrütet.

In Abb. 5B sind die Absorptionsmaxima der Cytochrome durch gestrichelte senkrechte Linien eingezeichnet, von links nach rechts Cytochrom $\underline{c}$ (547 nm), $\underline{c}_1$ (553 nm), $\underline{b}$ beim Wildtyp (558,5 nm) und $\underline{b}$ bei M4721 (560 nm). Rechts liegt das Maximum für Cytochrom $\underline{a}.a_3$ (602 nm).

Mutanten. In bestimmten Bereichen der COB-Region treten sie gehäuft auf:
1. In den ersten Kartierungsklustern einzelne verstreut liegende Mutanten; 2. alle Mutanten der Kluster 10 bis 19; 3. der überwiegende Teil der Mutanten in den Klustern 22, 23 und 26 bis 29; 4. die hs-Mutante in Kluster 34. Wie aus Tabelle 2 zu ersehen ist, besteht eine gute Korrelation zwischen der Lage der Mutationsorte temperatursensibler und box$^-$-Mutanten. Dies deutet darauf hin, daß die genannten Kluster von Mutationsorten Sequenzen bezeichnen, deren Kodierungsgehalt sich von anderen Sequenzen der COB-Region grundsätzlich unterscheidet. Auffallend ist der Befund, daß Mutationen in einzelnen Bereichen nur das Cytochrom b beeinflussen, während andere zusätzlich Einfluß auf Cytochrom aa_3 ausüben (vgl. Diskussion).

3. Gelelektrophorese mitochondrialer Translationsprodukte

Um die von Douglas und Butow (1976) entwickelte Methode der SDS-Gradienten-Gelelektrophorese auch für die Analyse von cob$^-$-Mutanten anwenden zu können, wurden von Haid (1979) einige Verbesserungen des Markierungsverfahrens erarbeitet, die bei den hier durchgeführten Versuchen berücksichtigt wurden. Das Bandenmuster der mitochondrialen Translationsprodukte des Wildtypstammes 777-3A ist in Abb. 6, rechts, dargestellt. Vier Hauptbanden sind klar voneinander getrennt: 1. Breite, diffuse Bande, MG etwa 40 000 d, entspricht der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase; 2. Untereinheit II der Cytochrom c Oxidase, MG etwa 33 000 d; 3. vermutetes Apocytochrom b, MG etwa 30 000 d; 4. Untereinheit III der Cytochrom c Oxidase, MG etwa 22 000 d (Schatz und Mason 1974; Douglas und Butow 1976).

3.1. Mutationen in kodierenden Sequenzen

3.1.1. Muster der mitochondrialen Translationsprodukte

In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (Tzagoloff et al. 1976; Mahler et al. 1977; Claisse et al. 1977; Haid 1979) fehlt 127 von 134 untersuchten cob^--Mutanten das Polypeptid vom MG 30 000 d, welches vermutlich Apocytochrom b entspricht, siehe Tabelle 2 und Abb. 6. Dabei konnte eine sehr gute Übereinstimmung zwischen der Abwesenheit von Cytochrom b im Spektrum und dem Verlust der Bande vom MG 30 000 d festgestellt werden, vorausgesetzt, die temperatursensiblen Mutanten werden bei nicht-permissiver Temperatur markiert. Neben dem Verlust der Bande vom MG 30 000 d fällt als weitere Veränderung beim Vergleich der Polypeptide von Wildtyp zu Mutanten auf, daß eine große Anzahl der cob^--Mutanten (48 von 134) eine "neue" Bande vom MG 8 000 bis etwa 30 000 d besitzt, also einem MG geringer als dasjenige des Wildtyp-Apocytochrom b. Verteilt auf die Gesamtheit der Mutanten treten kontinuierlich alle Zwischengrößen auf (siehe Tabelle 2 und Abb. 6).

Wie Slonimski et al.(1978) und Haid et al.(1979) bei ihrer Analyse weniger Mutanten vermutet haben, läßt sich jetzt durch die Erweiterung der Untersuchung sicher ein Zusammenhang zwischen der Größe eines neuen Produktes und der Lage der entsprechenden Mutation auf der Karte feststellen:

1. Mutationen, die neue, im MG kleinere Polypeptide bedingen, treten in bestimmten Bereichen der COB-Region auf, gemeinsam nur mit wenigen Mutationen, die das Wildtyp-Muster nicht verändern. In der vorliegenden Analyse kartieren diese Mutationen in den Klustern 4 bis 10, 20 bis 22, 24 bis 25, 30 und 31 bis 36. Diese fünf Segmente der COB-Region werden im Folgenden mit

α, β, γ, δ und ε bezeichnet.

2. Innerhalb der Segmente steigt das MG ebenso wie von Segment zu Segment in einer und stets der gleichen Richtung. Dies erinnert an klassische Kolinearität, bei der die Aufeinanderfolge der DNS-Basentripletts die direkte Aufeinanderfolge der Aminosäuren im Protein bestimmt. Es ist also anzunehmen, daß die Mutation als non-sense oder frame shift vorzeitige Termination des durch die fünf Segmente kodierten Polypeptide bedingen. (frame shift könnte die geringen Abweichungen von strikter Kolinearität erklären, indem Verlust oder Zunahme um ein Basenpaar in der DNS durch Änderung der Triplett-Zusammensetzung erst später zu einem non-sense Kodon und damit zum Abbruch der Proteinsynthese führt, z. B. Mutante M4901). Folgt man dieser Annahme, so betreffen Mutationen in α bis ε Kodons des gleichen Polypeptids.

3. Abweichend vom klassischen Schema der Kolinearität liegt die Sequenz, welche das Polypeptid kodiert in fünf Teilsequenzen, α bis ε vor. Sie sind voneinander durch große genetische und physische Abstände (vgl. Kapitel D, Slonimski et al. in prep.; Grosch et al. 1981) getrennt. Die ersteren sind daher als Exons eines split genes oder Mosaik Genes anzusehen.

Einige Mutanten, speziell im Bereich β, haben Apocytochrom b nicht vollständig verloren, zeigen jedoch zusätzlich eine Bande niedrigeren MG´s. Diese Mutanten-Phänotypen können entstehen, wenn durch die Mutation ein Stopkodon gebildet wird, das bei der Translation unvollständig wirkt, d.h. gelegentlich "überlesen" wird und somit die Bildung von im MG kompletten Cytochrom b zulässt, meistens jedoch Kettenabbruch bei der Proteinsynthese bewirkt. Ein MG der neuen Bande von über 30 000 d tritt bei der Mutante

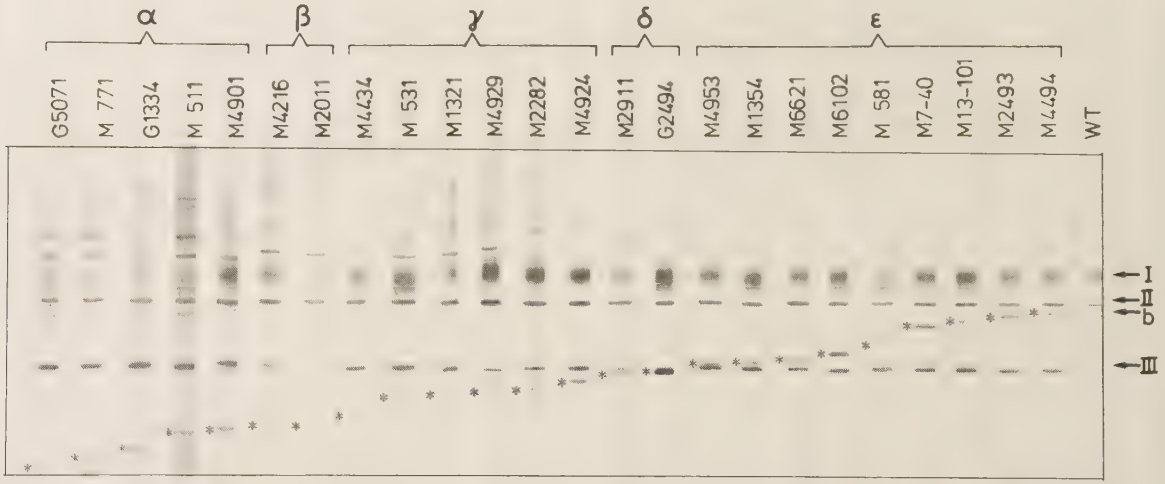


Abb. 6 SDS-Gelelektrophorese mitochondrialer Translationsprodukte

Zellen wurden mit $^{35}SO_4^{2-}$ in Gegenwart von CHX in vivo markiert, Mitochondrien isoliert und die Translationsprodukte gemäß ihrem MG in 10 - 15 % exponentiellen SDS-Acrylamidgradientengelen aufgetrennt. Die Pfeile bezeichnen Untereinheit I, II, III der Cytochrom c Oxidase und Apocytochrom b des Wildtyps. Sterne (*) weisen auf "neue " Banden bei den verschiedenen Mutanten hin, deren MG in Tabelle 2 angegeben sind. Die Reihenfolge der Mutanten entspricht derjenigen der genetischen Karte (Abb. 2), die Kartierungsbereiche sind im oberen Teil der Abbildung durch Klammern und griechische Buchstaben angegeben, siehe Text.

M4494 auf und wird erklärbar durch Mutation des (der) natürlichen Stopkodone und weitergeführte Proteinsynthese bis zu einem folgenden Stopkodon.

In den Exons α, γ und ε werden je zwei Mutanten gefunden, die im Gelmuster mit dem des Wildtypes identisch sind. Diese können als "Missense"-Mutationen, die zum Einbau einer falschen, die Funktion störende Aminosäure in das Protein führen, gedeutet werden. Bei Mutanten der Kluster 1 bis 3 im Bereich α wurden keine neuen Banden gefunden. Verfolgt man die Kontinuität der abnehmenden MG in α nach rückwärts, so würde man bei diesen Mutanten Banden vom MG < 8 000 erwarten, die jedoch nicht auftreten. Möglicherweise können sie in dem hier benutzten Markierungs- und Gelsystem nicht sichtbar gemacht werden oder sie werden vorzeitig abgebaut.

Wenn diese Hypothesen korrekt sind, müssen die "neuen"Polypeptide Fragmente eines Polypeptids, vermutlich Apocytochrom b sein, dessen Translation am Messenger in Richtung von OLI2 nach OLI1 erfolgt. Die Größe der Exons reicht von wenigen (ca. 30) Basenpaaren Länge bei β und δ bis zu etwa 350 bei Exon α . Die Sequenz α kodiert somit grob die Hälfte des COB Genproduktes, beginnend am N-terminalen Ende. Die MG der neuen Bande der in diesem Bereich gefundenen Mutanten reichen von 8 000 bis 14 000 d. Die vier folgenden Sequenzen kodieren: β für weniger als 2 000 d, bzw. MG von 15 000 d; γ für etwa 4 000 d, bzw. 16 000 bis 19 500; δ weniger als 2 000 d, bzw. 21 000 bis 22 000 d und ε etwa 8 000 d, bzw. 22 500 bis 30 500 d. Sie werden getrennt, sowohl in genetischer als auch in physischer Hinsicht, durch nicht kodierende Sequenzen oder Introns, die in der Größe zwischen 650 und 2 100 bp variieren (Grosch et al. 1981), siehe Diskussion und Abbildung 12.

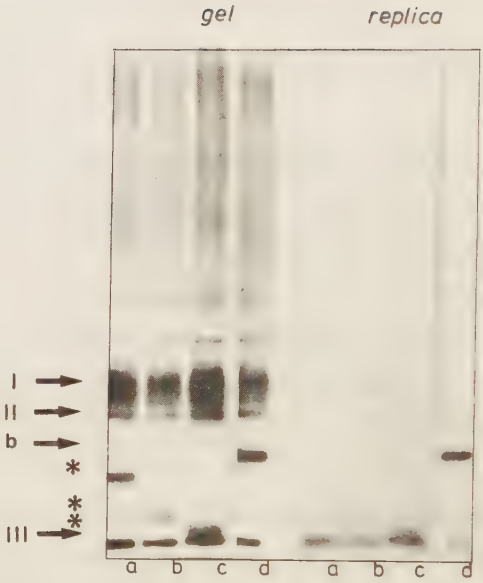
3.1.2. Immunologischer Nachweis Apocytochrom b-verwandter Peptide

Eine Reihe von Hinweisen führt zu der Annahme, daß die Bande des MG' 30 000 im SDS-Gel, also das Produkt der COB-Region, mit dem Apocytochrom b identisch ist (Slonimski et al. 1978; Haid 1979). Ein Beweis für diesen Zusammenhang sowie für die Natur der in den Mutanten der Segmente α - ε der COB-Region auftretenden verkürzten Peptide wird im Folgenden durch immunologische Verfahren unter Verwendung von Antikörpern gegen Apocytochrom b erbracht.

Immun-Replika-Technik zum Erkennen von Cytochrom b: Es wurde versucht mit der Immun-Replika-Technik (Showe et al. 1976), die von Cabral et al. 1978 für die mitochondriale UE II der Cytochrom c Oxidase angewendet wurde, die Reaktion von Apocytochrom b-Antikörpern mit der Bande vom MG 30 000, sowie kleineren Peptiden nachzuweisen. In Abb. 7 ist das Ergebnis dieses Versuchs unter Verwendung dreier cob$^-$-Mutanten mit niedrigeren Polypeptid-Fragmenten aus dem Kartierungsbereich ε (Spalten a, b, c) und des WT (Spalte d) dargestellt. Im Autoradiogramm des Agarose-Replika ist zu erkennen, daß in Spalte d (WT) ein signifikantes Präzipitat mit Antiserum gegen Cytochrom b gebildet wurde, das an der Position der Bande vom MG 30 000 liegt. Im unteren Bereich des Replika ist kontinuierlich eine Bande sichtbar, die der UE II der Cytochrom c Oxidase entspricht. Es ist unklar, ob hier eine Kreuzreaktion zwischen Antikörpern gegen Cytochrom b und UE II stattgefunden hat oder ob das Replika-Gel unzureichend gewaschen wurde. Diese Bande ist jedenfalls viel schwächer, als die vom MG 30 000, obwohl die Ausgangsmengen im Acrylamidgel etwa gleich waren.

Abb. 7

Immunpräzipation von Apocytochrom b durch Verwendung der Replika-Technik



Mit $^{35}SO_4^{2-}$ markierte mitochondriale Proteine des Wildtyps (Spalte d) und der Mutanten M7-40 (Spalte a, neues Fragment MG 28 000), M4891 (Spalte b, neues Fragment MG 24 000) und M6621 (Spalte c, neues Fragment MG 23 000) wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel gemäß ihrem MG getrennt. Dieses Gel wurde mit einem Agarosegel, das Antiserum gegen Cytochrom b enthielt, überschichtet (Immun-Replika-Technik). Links im Bild das Autoradiogramm des später getrockneten Polyacrylamidgels, rechts das des Agarose-Replikas. Die UE I, II, III der Cytochrom c Oxidase und Apocytochrom b des WT sind mit Pfeilen gekennzeichnet, die neuen Fragmente mit Sternchen.

Insgesamt wurden 11 cob⁻-Mutanten der gleichen, direkten Immunpräzipitation im Agarosegel unterworfen. Allen Mutanten fehlt das beim WT immunreagierende Polypeptid von 30 000 d. Das Ergebnis, daß 1. ein Protein des MG' 30 000 mit Apocytochrom b-Antiköpern reagiert und 2. cob⁻-Mutanten diese immunreagierende Bande verloren haben, stützt die Annahme, daß das in COB kodierte Protein des MG' 30 000 mit Apocytochrom b identisch ist.

Eine Mutante (M6621) zeigt eine, wenn auch geringe positive Immunantwort, erkennbar als Bande des MG' 23 000 d, gleich oberhalb der UE III der Cytochrom c Oxidase. Für die negative Reaktion der übrigen 10 cob⁻-Mutanten können mehrere Gründe vorliegen: 1. Die vorhandene Menge an neuen, verkürzten Proteinen ist von Anfang an zu gering, um ein unlösliches Aggregat mit den Antikörpern im Agarosegel zu bilden. 2. Die antigenen Determinanten sind durch Verkürzung des Apocytochrom b verloren gegangen. 3. Apocytochrom b ist ein sehr hydrophobes Protein, das nur schwer aus der SDS-Polyacrylamidschicht in die Agaroseschicht diffundieren kann.

Immunpräzipitation mit Staphylococcus aureus Membranprotein: Eine sensiblere Methode des Antigen-Antikörper-Reaktionsnachweises wurde in der Immunpräzipitation mit fixierten Staphylococcus aureus Bakterien nach Kessler 1976, gefunden (Abb. 8). Dabei werden $^{35}SO_4^{2-}$ markierte mitochondriale Proteine in SDS-Puffer gelöst und in Gegenwart von überschüssigem Triton X-100 mit Antiseren inkubiert. Durch Bindung an Staphylococcus aureus Oberflächen können die Immunkomplexe präzipitiert und von anderen mitochondrialen Proteinen gereinigt werden (vgl. Material und Methoden). Die Immunpräzipitate werden

parallel zu den gesamten mitochondrialen Proteinen in 10 - 15 % Polyacrylamidgradientengelen elektrophoretisch aufgetrennt.

Immunreaktion des Wildtyps: In Abb. 8 (rechts) ist die Immunantwort des Wildtyps aufgezeigt. Mit Serum gegen Cytochrom b (Spalte b) wird eine einzige Bande vom MG 30 000 gefällt, die auf gleicher Höhe mit der Bande vom MG 30 000 bei Auftrennung von mitochondrialen Proteinen (Spalte m) verläuft.

Betrachtet man die Original-Autoradiogramme, so fallen im Immunpräzipitat von Cytochrom b noch sehr schwach sichtbare, diffuse Banden vom MG etwa 50 000, 80 000 und eine noch höhere auf, die bei langem Exponieren des Films auch bei einigen Mutanten sichtbar gemacht werden konnten. Vermutlich handelt es sich dabei um Aggregate von Cytochrom b Molekülen mit den Antikörpern, die nicht vollständig dissoziiert wurden; diese Banden werden im Verlauf der Arbeit nicht mehr berücksichtigt.

Immunreaktion der Fragmentmutanten: Die Auftrennung der Immunpräzipitate der Exon-Mutanten, deren Mutationsorte in den Bereichen α, β, γ, δ, und ε liegen, zeigt in den entsprechenden Spalten b in Abb. 8 im wesentlichen eine einzige Bande (siehe auch Solioz und Schatz 1979). Die Lage dieser Bande entspricht der als "neue" Bande bezeichneten in den Spalten m. In Exon ε reagieren alle Banden vom MG 30 500 d bis 22 500, in δ von 22 000 bis 21 000, in γ von 19 500 d bis 16 000 und in β die von 15 000 mit den Antikörpern. In Mutanten des Bereichs α werden Immunantworten mit Proteinen vom MG 14 000 bis 8 000 gefunden (Tabelle 2). Kleinere Mu-

tantenpeptide als 8 000 d, die bei Mutanten der Kluster 1 bis 4 zu erwarten wären, (vgl Kapitel 3.1.) wurden auch mit der hochsensiblen immunologischen Nachweismethode, die der direkten Analyse des gesamten mitochondrialen Proteins weit überlegen ist, nicht entdeckt. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, 1. daß im WT das mitochondrial synthetisierte Protein des MG' 30 000 d als einziges mit Apocytochrom b-Antikörpern erkennbar reagiert und 2. daß in allen cob$^-$-Mutanten, die ein neues Polypeptid vom MG kleiner 30 000 d zeigen, die Wildtyp-Bande fehlt - bzw. stark verringert ist (in β-Mutanten und temperatursensiblen) - und daß dieses neue Peptid immunpräzipitiert wird. Die verkürzten neuen Produkte sind demnach frühzeitig terminierte Peptide des gleichen Proteins, nämlich des Apocytochrom b. Der Nachweis der Kodierung des Apocytochrom b in der COB-Region gilt damit als erbracht.

Zusätzlich zeigen alle Mutanten (Ausnahmen M7-40 und M13-101, anderer Ausgangsstamm) der Bereiche β bis ε einheitlich eine, oft erst durch die Antikörperfällung sichtbar gewordene Bande vom MG 42 000 d. Teilweise mußten die Filme erst länger exponiert werden, um die neue Bande zu erkennen; sie ist aber spezifisch, da sie nach Vorfällung der gelösten Mitochondrien mit Kontrollserum ebenfalls gefunden wird. Der Wildtyp und die Fragmentmutanten wurden zusätzlich einer Präzipitation mit Antiserum gegen UE 1 der Cytochrom c Oxidase unterworfen (Abb. 10). Es zeigt sich, daß dieses Serum (Spalte a) nicht nur die Bande vom MG etwa 40 000 d ausfällt, sondern auch gegen UE II reagiert, wenn auch schwächer; es ist also nicht monospezifisch. Beim Wildtyp und den Mu-

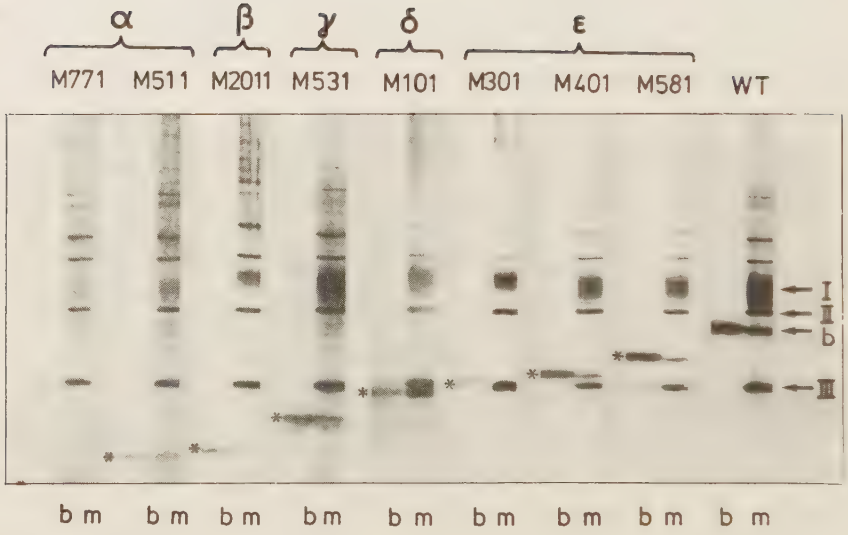


Abb. 8

Reaktionen von Fragmenten der Exonmutanten mit Antikörpern

Aufgetragen wurden: die markierten mitochondrialen Proteine insgesamt in Spalte m, die mit Hilfe von Staphylococcus aureus präzipitierten Produkte bei Verwendung von Antikörpern gegen Apocytochrom b in Spalte b. Durch Pfeile sind die Positionen von UE I, II, III der Cytochrom c Oxidase und von Cytochrom b vermerkt; Sternchen weisen auf neue Banden hin, die mit Anti-Apocytochrom b-Serum reagiert haben. Weitere Beispiele und Erklärungen siehe Abb. 10.

tanten aus den Exonbereichen β bis ε erfolgt mit Antiserum gegen UE I eine gleichmäßig starke positve Reaktion, wie schon nach Betrachtung der aufgetrennten mitochondrialen Translationsprodukte als solche zu erwarten war. Anders die Reaktion der cob$^-$-Mutanten des α-Bereichs: Mutanten, bei welchen im Gel nur sehr geringe Mengen an UE I der Cytochrom c Oxidase nachgewiesen werden konnten, zeigen als Präzipitat eine deutlich positive Reaktion; einige andere weisen überhaupt keine UE I auf. Der (teilweise) Verlust der UE I bei Mutanten des Exons α deutet auf eine weitere, vermutlich regulatorische Funktion hin, an der diese Region beteiligt sein könnte (siehe Diskussion).

3.2. Mutationen in nicht-Cytochrom b-kodierenden Sequenzen

3.2.1. Elektrophoretische Auftrennung der gesamten mitochondrialen Proteine

Mutanten, deren Mutationsort zwischen den Exonbereichen für Apocytochrom b der COB-Region liegt, wurden bisher durch folgende Kriterien charakterisiert:

1. Gehäufte Temperatursensibilität der Atmungsfähigkeit der Zellen (vgl. Kapitel 2.1.).
2. Fehlendes Cytochrom b -und bei ca. 90 % der Mutanten gleichzeitig Cytochrom aa_3 - Spektrum (vgl. Kapitel 2.2.).

Diese Kriterien treffen auf gut 1/3 aller untersuchten COB-Mutanten zu. Die entsprechenden Mutationsorte wurden in den Bereichen zwischen α und β, β und γ, γ und δ kartiert. Im Bereiche δ/ε wurden bisher keine Mutanten gefunden. Eine längere Sequenz zwischen δ und ε, also ein Intron, ist ableitbar 1. aus den Daten der Rekombinationsanalyse als maximale Häufigkeit auftretender Rekombinanten und der Häufigkeit der rho$^-$ Deletionen zwischen Mutante G2494 und Mutante

M4953, 2. aus elektronenmikroskopisch beobachteten RNS-DNS Hybridisierungen (Grivell et al. 1979), 3. aus Restriktionskartierung der δ und ε Mutanten (Grosch et al.(1981).

Die Auftrennung in Gradientengelen der mit $^{35}SO_4^{2-}$ markierten Proteine dieser Mutanten, wie sie für den Wildtyp und die Exon-Mutanten vorgenommen wurde, lieferte Aussagen, welche mit den spektroskopischen Befunden übereinstimmten: Neben dem Verlust der Cytochrom b-Bande (MG 30 000 d) hatten alle Mutanten des Bereichs α/β und die meisten von β/γ und γ/δ zusätzlich die Bande der UE I der Cytochrom c Oxidase verloren (siehe Tabelle 2). Gleichzeitig treten eine bis mehrere neue Banden mit MG von 12 000 bis 69 000 d bei jeder untersuchten Mutante auf.

Im Kartierungsbereich β/γ und γ/δ sind die neuen Banden aller entsprechenden Mutanten im MG sehr einheitlich (Abb. 9b, Tabelle 2), auch wenn durch die Kartierung festgestellt wurde, daß die Mutationsorte weder identisch noch sehr eng gekoppelt sind (Abb. 2 und 3). In allen untersuchten Mutanten des Introns γ/δ sind neue Banden vom MG 23 000 und 36 000 erkennbar (2 Ausnahmen im Randbereich zu γ). Zudem ist meist eine Bande von 28 000 - und wo sie fehlt eine Bande von etwa 12 000 - festzustellen. Dabei scheint keine Korrelation zwischen Vorhandensein oder Abwesenheit der UE I der Cytochrom c Oxidase zu bestehen. Zusätzlich wurde bei der Mutante M281 eine Bande vom MG 50 000 und bei M4751 eine von 69 000 gefunden. Die wenigen im β/γ Bereich gefundenen Mutanten (Tabelle 2) zeigen schwache neue Banden bei 15 000, 16 000 und 19 000 d; die Mutante M4881 weist außerdem eine Bande bei 29 000 auf, Mutante G5043 eine verstärkte Bande bei 50 000 d.

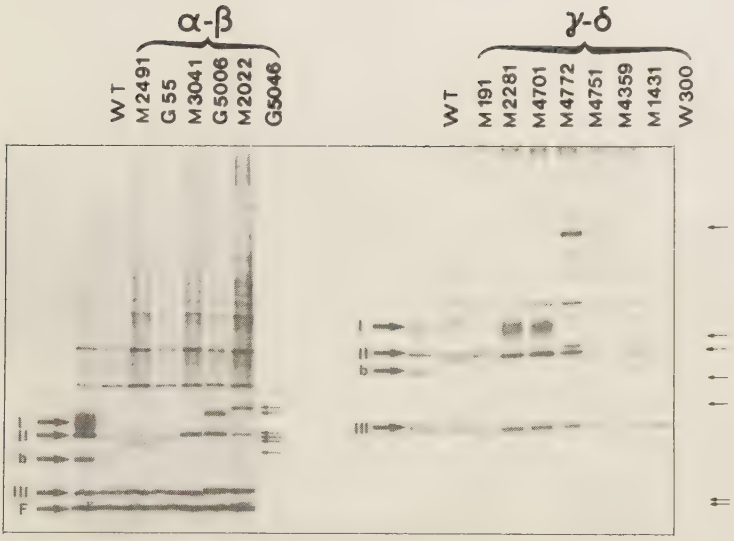


Abb. 9 a

Abb. 9 b

Mitochondriale Translationsprodukte von Mutanten in den Introns **α/β** und **γ/δ** .

Die Polypeptide wurden wie in der Legende zu Abb. 6 mit $^{35}SO_4^{2-}$ markiert und isoliert. Die Auftrennung erfolgte in Abb. 9 a in einem 7-12%igen SDS-Polyacrylamidgradientengel, in Abb. 9 b in einem 10-15%igen. Die kräftigen Pfeile links bezeichnen Untereinheiten I, II, III der Cytochrom c Oxidase und Apocytochrom b des Wildtyps; F weist auf die Wanderungsfront im Gel hin. Die kleinen Pfeile rechts markieren Positionen "neuer" Banden (MG siehe Tabelle 2). Die Anordnung der Mutanten erfolgte in Korrelation mit der genetischen Karte.

Dem Intron α / β zugeordnete Mutanten bilden neue Translationsprodukte zwischen 15 000 d und 42 000 d, beginnend im α-proximalen Bereich mit MG von 15 000 und kontinuierlich zunehmend bis zum β-proximalen Bereich. Einige dieser neuen Banden, die langsamer wandern als Apocytochrom b wurden in Abb. 9 a dargestellt. Der gleichzeitige Verlust von UE I ist erkennbar.

3.2.2. Immunreaktion der Intronmutanten

Um etwaige Verwandtschaft der neuen Translationsprodukte mit den fehlenden Wildtyp-Proteinen Apocytochrom b und Cytochrom c Oxidase UE I zu prüfen, wurde analog zu den Immunpräzipitationen von Exonmutanten die Reaktion von Anti-Cytochrom b - und Anti-UE I-Serum mit markierten mitochondrialen Proteinen von Intron-Mutanten getestet: Nicht eine einzige der neuen Banden reagierte mit Anti-UE I-Serum. Alle neuen Polypeptide (mit Ausnahme einer Serie der γ / δ Mutanten) ließen sich jedoch mit Anti-Cytochrom b-Serum fällen, wobei zusätzlich neue, bisher übersehene Banden, erkennbar wurden. Sie sind damit als Teil-Sequenzen von Apocytochrom b identifiziert.

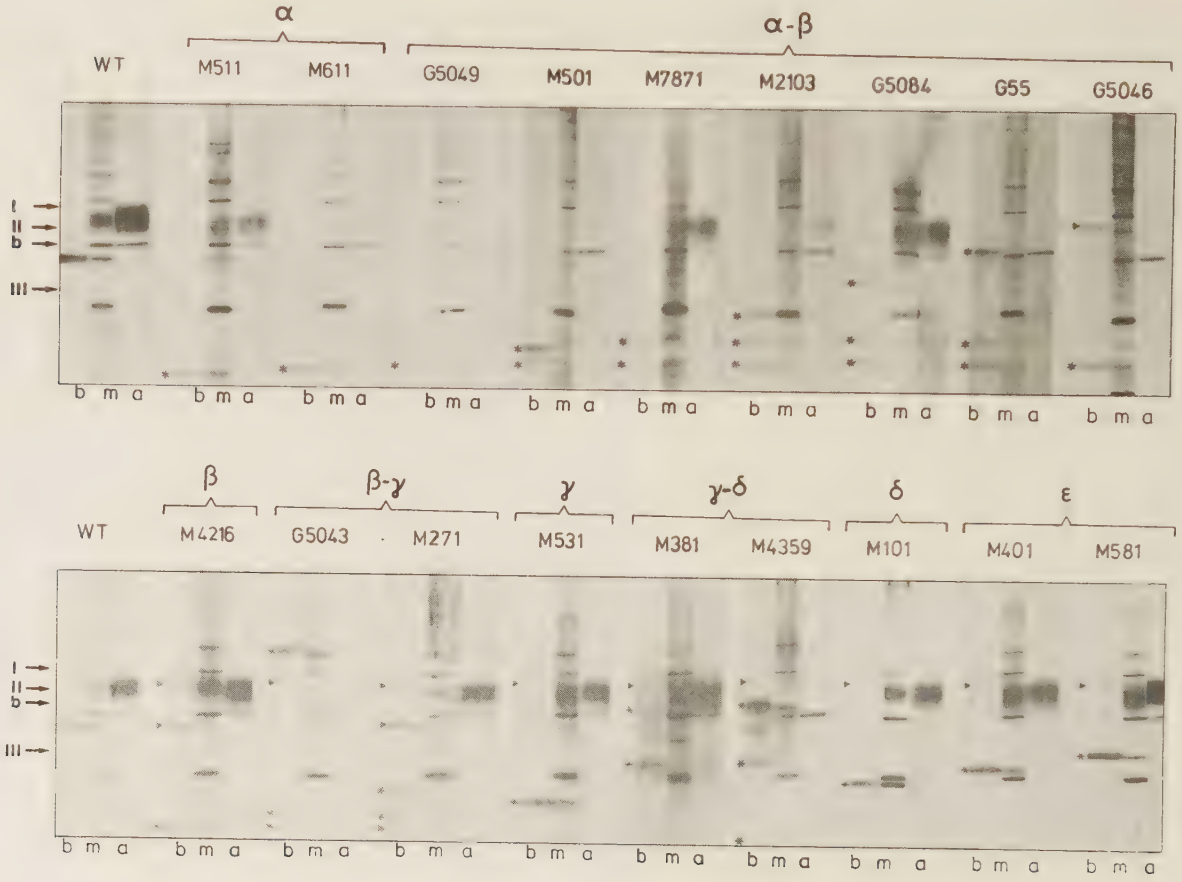
Der Befund, daß Mutanten des gleichen Introns weitgehend gleiche neue Banden aufweisen (siehe Kapitel 3.2.1.) wird durch den immunologischen Test bestätigt. Die in 3.2.1. beobachtete Serie von neuen Peptiden in α / β -Mutanten und die bereits angesprochene Systematik der MG-Zunahme von α (14 000 d) nach β (42 000 d) wird durch den immunologischen Nachweis verdeutlicht. Der Analyse dieser Beobachtung wird ein besonderes Kapitel gewidmet (siehe 3.2.3.).

Die relativ kleine Zahl von β / γ Mutanten, die alle in dem Exon β-nahen Teil des Introns kartieren, zeigen in Ansätzen eine ähnliche Systematik der Molekulargewichts-Zunahme: Die erste, auf β folgende Intron-Mutante zeigt eine neue, Apocytochrom b verwandte Bande von 15 000 d. Dieses

Abb. 10

Identifizierung neuer Polypeptide von Mutanten aus Intron- und Exon-Bereichen

Hefezellen von 18 *cob*⁻ Mutanten und vom Wildtyp wurden mit $^{35}SO_4^{2-}$ markiert und die Mitochondrien isoliert. Ein Teil des Materials (etwa 0,5 bis 1 x 10^6 cpm) wurde mit Serum, das Antikörper gegen Cytochrom *b* oder gegen UE I der Cytochrom *c* Oxidase enthielt, inkubiert (Kreike et al. 1979) und an den Oberflächen von fixierten *Staphylococcus aureus* Zellen präzipitiert. Diese gewaschenen und resuspendierten Präzipitate wurden parallel zu gelösten gesamt-mitochondrialen Proteinen der SDS-Polyacrylamid-Gradientenelektrophorese unterworfen. Spalte b entspricht den aufgetrennten Präzipitaten nach der Behandlung mit Anticytochrom *b* Serum, Spalte m zeigt die gesamten mitochondrialen Proteine, Spalte a Reaktionen mit Serum gegen UE I der Cytochrom *c* Oxidase. Durch Pfeile sind die Positionen von UE I, II III der Cytochrom *c* Oxidase und von Cytochrom *b* vermerkt; Sternchen weisen auf neue Banden hin, die mit Anti-Apocytochrom *b* Serum gefällt wurden, die kleineren Dreiecke auf die präzipitierten Wildtypenbanden von 30 000 d für Cytochrom *b* und 42 000 d für das neu entdeckte Protein.


α
α-β
WT
M511
M611
G5049
M501
M7871
M2103
G5084
G55
G5046
I
II
b
III
b m a
β
β-γ
γ
γ-δ
δ
ε
WT
M4216
G5043
M271
M531
M381
M4359
M101
M401
M581
I
II
b
III
b m a

Peptid synthetisieren auch alle folgenden β/γ Mutanten. Die 2. Mutante des gleichen Klusters bildet zusätzlich ein Peptid von 16 000 d, das alle folgenden β/γ -Mutanten auch zeigen. Ab der 3. Mutante kommt bei allen weiteren eine Bande vom MG 19 000 hinzu (Abb. 10). Das Protein des MG 42 000 wird bei allen Mutanten, wenn auch in geringer Menge, gefunden. Die Mutante G5043 weist eine verstärkte Bande beim MG-Bereich 50 000 auf, die, wie alle anderen, mit Anti-Apocytochrom b Serum reagiert. Ob das Protein vom MG 29 000 der Mutante M4881 mit dem Antiserum zu präzipitieren ist, konnte nicht geklärt werden, da dessen Bande zu nahe am echten Apocytochrom b liegt, das in dieser "leaky" Mutante als deutliche Bande erkennbar ist.

Die 21 im Kartierungsbereich γ/δ gefundenen Mutanten zeigen durchwegs mit Anti-Cytochrom b Serum präzipitierte Banden mit 23 000 und 36 000 d (siehe Tabelle 2). Sehr schwach ist ein Translationsprodukt mit 20 000 d sichtbar, das nicht in die Tabelle aufgenommen wurde. Die nach Elektrophorese der gesamten Mitochondrienproteine auftretende starke Bande bei etwa 28 000 d reagiert kaum mit den Antikörpern. Das Peptid von 12 000 der Mutanten M4359, G1659, M1431 zeigt keine Fällung, auch nicht mit Anti-UE I der Cytochrom c Oxidase (Abb. 10). Da entweder nur die Bande von 28 000 oder die von 12 000d sichtbar ist, die beide nicht mit Antiseren reagieren, stehen sie möglicherweise in einem gewissen Zusammenhang.

Im γ-nahen Bereich des Introns γ/δ liegen einige Mutanten die ein etwas abweichendes Bandenmuster haben:

M281, mit dem nicht präzipitierbaren Peptid von 29 500 d zeigt zusätzlich eine präzipitierbare Bande bei 50 000. Die Mutanten G2457 und M191 weisen Translationsprodukte von 20 000, 22 000 und nicht erkennbar verwandt mit Apocytochrom b, 28 000 d auf,

bzw. 23 000 und 32 000 d, beide mit antigenen Determinanten. Ein in keiner anderen cob$^-$-Mutante gefundenes Protein ist das vom MG 69 000 bei der Mutante M4751, das nicht mit Antiserum reagiert.

Auch bei den Intron-Mutanten γ/δ wird jeweils das Protein vom MG 42 000 d nach Antikörper-Präzipitation mit Anti-Apocytochrom b gefunden, wie bei den Intron-Mutanten β/γ und bei allen Exonmutanten zwischen β und ε. Es fällt auf, daß alle neuen Banden der Introns β/γ, γ/δ und des im folgenden beschriebene α/β, soweit sie mit Anti-Apocytochrom b Antikörpern reagieren, gleichem oder höherem MG entsprechen, als das Fragment der jeweils vorhergehenden Exon-Mutante.

3.2.3. Intron-kodierte Peptide

Intron α/β : Die im Exon α-nahen Bereich kartierten vier Mutationen G5049, M1301, G5064 und M4873 bedingen eine neue Bande vom MG 15 000, d.h. wiederum Polypeptide gleicher Größe oder größer als die letzte Fragmentmutante des Exons α sie aufweist. Diese Mutationsorte liegen nach Kartierungsdaten relativ weit voneinander entfernt, im Unterschied zu der darauf folgenden, großen Anzahl von weiteren Intronmutationen in α/β. Die Rekombinationshäufigkeit beträgt für Kreuzungen zwischen den letzten Mutanten in α und G5049, M1301 und G5064 unter 1 %, für die Mutante M4876 dagegen 6 %. Alle haben dabei das gleiche Fragment vom MG 15 000. Die neuen Polypeptide der nachfolgenden α/β Mutanten nehmen in der Größe bis 42 000 d kontinuierlich zu, in gleicher Reihenfolge wie die Anordnung der entsprechenden Mutationsorte auf der genetischen Karte (Tabelle 2, Abb. 10), wobei die Ausprägung der 15 000 und 18 000 d Bande gleichzeitig erhalten bleibt.

Analog zum oben benutzten Kolinearitätsprinzip identifiziert eine Serie kontinuierlich länger werdender Produkte Fragmente des Endprodukts. Dies ist der Fall für Apocytochrom b; das gleiche Prinzip kann auch auf die Serie von neuen Banden des Introns α / β angewendet werden. Diese Serie, bestehend aus 32 Mutanten in sieben Gruppen, die mit Apocytochrom b-Serum reagierende neue Polypeptide synthetisieren, die kontinuierlich von 15 000 d bis 42 000 d zunehmen, bildet sich aus Fragmenten des Endproduktes, eines 42 000 d Proteins. Es stellt sich die Frage, wo der erste Teil dieses Polypeptids kodiert ist, d.h. welche Mutanten Fragmente mit Molekulargewichten unter 15 000 d bilden, die der Serie von 15 000 - 42 000 vorangehen sollten. Hier bietet sich die Serie der Peptide von 14 000 bis 8 000 der Exonsequenz α an (M4577 bis G171). Formal kann man die Fragmente von 8 000 bis 14 000 zwei Serien vorzeitig beendeter Translationsprodukte der COB-Region zuordnen, nämlich der des Apocytochrom b (8 000 bis 30 000) und der eines 42 000 d Proteins. Man kann deshalb annehmen, daß die Sequenz α nicht nur einen Teil des Proteins Cytochrom b kodiert, sondern auch einen des zweiten Genproduktes, wobei erst die Sequenz α und anschließend die "intron"-Sequenz α / β translatiert würde. Somit wird α / β zu einer Exonsequenz für das 42 000 d Produkt. Demzufolge kodierte die COB-Region für mindestens zwei Proteine, Apocytochrom b (MG 30 000), translatiert von den Sequenzen α + β + γ + δ + ε und ein Polypeptid von 42 000 d, translatiert von α + α / β . Translationsstart und Leserahmen in α wären für beide Proteine gleich. Die Sequenzhomologie beider Proteine im α -Teil sorgt für die Präzipitation des 42 000 d Proteins durch Anti-Apocytochrom b Serum. Die Wirkungsweise des 42 000 Proteins wird weiter unten diskutiert.

Nach der Methode von Cleveland et al. 1977, wurde zusätzlich der Verwandtschaftsgrad des 42 000 d Produktes mit Apocytochrom b durch partielle Peptid-Spaltung ermittelt. Verglichen wurde die Cytochrom b Bande (MG 30 000) mit der Bande vom MG 38 000 der Mutante M1233 und dem 42 000 d Produkt. Die Auftrennung der Spaltprodukte nach Behandlung mit Chymotrypsin oder Ficin erfolgte elektrophoretisch in SDS-Gelen, die einen 13-17%igen Gradienten an Acrylmid enthielten. Dabei erwies sich die Homologie zwischen dem 38 000 d und dem 42 000 d Produkt als sehr weitgehend: Nach Ficinverdauung sind 8 von 10 entstandenen Spaltprodukten im mittleren Gelbereich identisch. Nach Chymotrypsineinwirkung sind im Bandenmuster der 38 000 d und 42 000 d Proteine 9 von 13 Banden auf gleicher Position. Im Vergleich mit Cytochrom b wurden nur 3 bzw. 5 entsprechende Banden gefunden (siehe Abbildung 11).

Diese Befunde ergänzen diejenigen der Antikörperantworten und zeigen, daß a) das Protein vom MG 42 000 nur Teile des Cytochrom b enthält, b) verkürzte Fragmente des 42 000 d Proteins gefunden werden.

Nachdem dieses Protein für die Funktion des Mitochondrions von so großer Bedeutung zu sein scheint, daß seine Abwesenheit zum Fehlen von Cytochrom b und Cytochrom aa_3 und damit zu Wachstumsunfähigkeit auf nicht vergärbarem Substrat führt, sollte es auch im Wildtyp (vermutlich in sehr geringer Menge) zu finden sein. Die Immunpräzipitation durch Anti-Apocytochrom b-Serum mit Hilfe von S. aureus - Membranprotein führte jedoch erst nach Anreicherung der Proteine des MG-Bereiches 40-45000 d und Abtrennung von Apocytochrom b im Gel zum Ziel (Grivell, persönliche Mitteilung). Weil das 42 000 d Protein

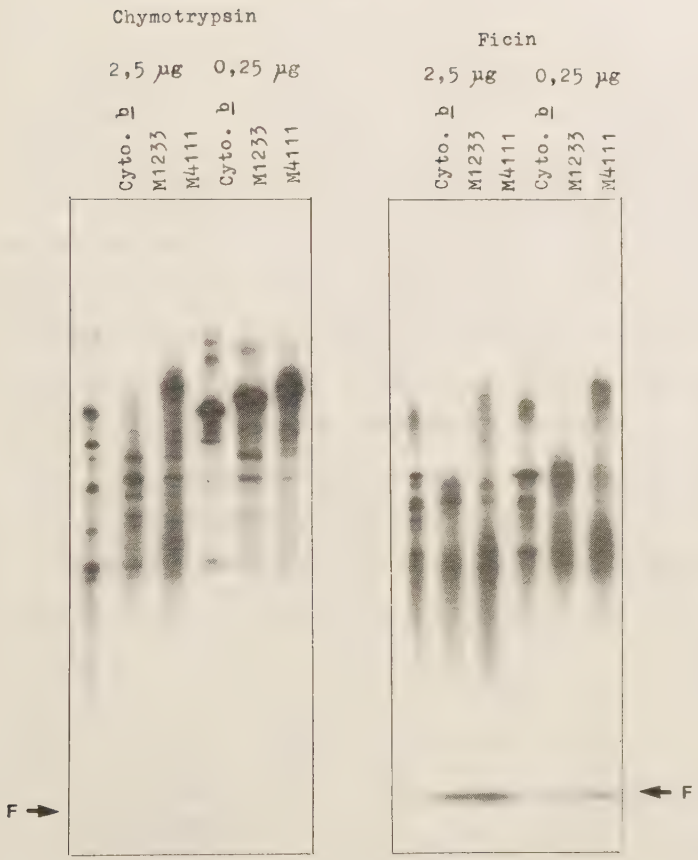


Abb. 11

Partielle Peptidspaltung in SDS-Gelen nach der Methode von Cleveland et al. 1977.

Unterschliedliches Fragmentierungsmuster nach begrenzter Proteleolyse des Apocytochroms b (MG 30 000), des Polypeptids vom MG 38 000 d der α/β Mutante M1233 und des Polypeptids vom MG 42 000 d der α/β Mutante M4111 mit Chymotrypsin (links) und Ficin (rechts). Die Menge der eingesetzten Protease ist oberhalb der Geltasche angegeben. F bezeichnet die Lösungsmittelfront.

1. in allen Produktanalysen der Mutanten der Exonbereiche β - ε ,
2. in allen Intronmutanten der Bereiche β / γ und γ / δ ,
3. im Wildtyp von S. cerevisiae, Stamm 777-3A gefunden wurde, ist es in Tabelle 2 in einer eigenen Spalte als natürliches mitochondriales Translationsprodukt aufgenommen. In den beiden untersuchten Mutanten M7-40 und M13-101 der New Yorker Kollektion, die nicht über eine Intron α / β -entsprechende Sequenz verfügen, konnte es nicht entdeckt werden.

Introns β/γ und γ/δ : Kann man den neuen Banden in den Introns β / γ und γ/δ eine ähnliche Genesis zugrunde legen, wie den Fragmenten des Introns α / β ? Die neu auftretenden Produkte sind jeweils länger als das letzte von Apocytochrom b im Exon zuvor. (siehe folgende Zusammenstellung:) Im Intron α / β ist die erste neue Bande, die gefunden wird, um 1 000 d größer (15 000 d), als die letzte des Exons α (14 000 d), bzw. um etwa 10 Aminosäuren, kodiert durch 30 Basenpaare; die nächste neue, konstant vorhandene Bande des Introns um weitere 100 bp oder 30 Aminosäuren länger (18 000 d). Anschließend nimmt die Länge der neuen Produkte bis zum MG 42 000 d zu. In Intron β / γ zeigen sich sehr ähnliche Verhältnisse. Die letzte Fragmentgröße im Exon β beträgt 15 000 d, die neuen Banden im Intron haben MG von 16 000 d und 19 000 d. Hier treten allerdings keine längeren Peptide auf, mit Ausnahme des 50 000 d Produkts der Mutante G5043. Neue Polypeptide der γ / δ -Mutanten sind die vom MG 20 000 d und 23 000 d, nachdem das letzte Fragment in γ etwa die Größe 19 500 d hat. Präzipitiert wird auch noch regelmäßig die neue Bande vom MG 36 000 d.
Welche Ursachen die wiederkehrende Zunahme der Peptidgrößen um etwa 10 Aminosäuren und weitere 30 Aminosäuren der Mutanten in

den Introns hat, wird nicht verstanden. Gewissheit besteht nur über die Tatsache, daß in die Introns β/γ und γ/δ hineingelesen wird. In Intron β/γ sicherlich bis zum Erreichen der Produktgröße von 19 000 d (= 40 Aminosäuren), möglicherweise bis zu einem Protein des MG' 50 000 d; entsprechend der physischen Länge von rund 1 400 bp des Introns wäre dies vorstellbar. In Intron γ/δ wird mindestens eine Sequenz von 500 bp translatiert, die Differenz des 36 000 d Produktes in γ/δ zur letzten Exonmutante in γ mit dem MG 19 500 d. Da das Intron γ/δ etwa eine Länge von 1 300 bp hat (siehe Abb. 13 der Diskussion), reicht der Kodierungsgehalt zu dieser Synthese aus.

4. Doppel-Mutanten cob^-_x . cob^-_y

Die im bisherigen Teil der Arbeit vorgelegten Befunde haben zu dem Schluß geführt, daß

1. die Sequenzen α, β, γ, δ, ε in einer mRNS vereinigt in Richtung von α nach ε zum Protein Apocytochrom b translatiert werden,
2. Kettenende—Mutationen in α bis ε zu einer Serie von neuen Translationsprodukten des gleichen Polypeptids führen.

Wenn dies richtig ist, sollte bei Kombination von zwei solcher Kettenende-Mutationen - Doppel-Mutanten cob^-_x x cob^-_y - die dem Translationsstart nächste Mutation epistatisch über die weiter entfernte sein, also der Phänotyp ersterer Mutation erscheinen. Zur leichteren Orientierung wurden bei der Auftrennung der $^{35}SO_4^{2-}$ markierten Proteine der Doppel-Mutanten-cob^-_x . cob^-_y jeweils die Ausgangsmutanten parallel der Elektrophorese unterworfen. Dadurch sind die von den Einfach-Mutanten her bekannten

neuen Banden leichter aufzufinden, bzw. ihre Abwesenheit sicherer festzustellen. Durch das Einkreuzen des kar1-Stammes weicht der Proteinhintergrund der Doppel-Mutanten-cob^-_x . cob^-_y etwas von dem der Einzelmutanten ab.

4. 1. Kombination von zwei cob^--Mutanten aus Exons

Betrachtet man die autoradiographierten Bandenmuster von Doppel-cob^--Mutanten, bei denen zwei Mutationen in Apocytochrom b - kodierenden Sequenzen α bis ε kombiniert wurden, so findet man - wie erwartet - allein das Fragment mit dem nierigeren MG. So wurde bei der Mutante G2286·M1354 nur eine Bande vom MG 18 000, nicht jedoch die vom MG 23 000 gefunden. Die in Leserichtung zuerst liegende Mutation erweist sich als epistatisch gegenüber der folgenden Mutation. Dies bestätigt den Befund, daß Mutationen in α bis ε das gleiche mRNS-Molekül betreffen. Die Daten stehen im Einklang mit den von Alexander et al. 1980, gefundenen. Bei allen Kombinationen zwischen β , γ , δ und ε ist gleichzeitig die Bande vom MG 42 000 zu erkennen. Nur eine Mutation in α , die dort zu verfrühtem Kettenabbruch führt, verhindert zudem die Synthese der 42 000 Bande.

4.2. Doppel-Mutanten-cob^-_x . cob^-_y aus Exon·Intron

Die Syntheseprodukte von Mutanten, die einen Mutationsort in einem Exon und einen zweiten in einem der darauf folgenden Introns enthalten, α· α/β und γ· γ/δ , sind in Abbildung 12 dargestellt. Die Doppel-Mutante-M1282 · M4901 zeigt das Fragment der Größe 15 000 d, wie die einfache Mutante M4901; M1431·G2286 weist das Fragment von 18 000 d auf, wie die γ - Mutante G2286 selbst. Die dem Intron vorausgehende Exonmutante erweist sich als epistatisch. Daraus ist zu schließen, daß die neuen Polypeptide von Intron-Mutanten an Transkripten trans-

latiert werden, die Exons und Introns der COB-Region enthalten und daß die Translation mit der α-Sequenz beginnend in die Intronsequenz hinein fortgesetzt wird (α + α/β) bzw. alle vorangehenden Exonsequenzen (α + β + γ) vor der Intronsequenz (γ / δ) gelesen werden. Die Bande vom MG 42 000 d ist ohne Antikörper bereits sichtbar, da sie nicht durch die UE I der Cytochrom c Oxidase verdeckt ist. Sie wird durch die doppelte Mutation in γ + γ/δ nicht beeinflußt, während sie nach der eingekreuzten Mutation in α verschwunden ist.

Bei Umkehr der Reihenfolge von Exon und Intron-Mutation, wenn also die erste Mutation in einem Intron und die zweite erst im folgenden Exon liegt (α/β · β und γ/δ · ε), zeigen sich neue Banden, die im wesentlichen denen der ersten, also der Intron-Mutation entsprechen. Auch dies ist mit der postulierten Synthese der Intron-Mutantenprodukte in Übereinstimmung. In Abb. 12 sind als Beispiele die Kreuzungen zwischen M4111 in Intron α/β x M2011 in Exon β und M1431 in Intron γ/δ x M1354 in Exon ε aufgezeigt. Die gleiche Analyse läßt sich zur Prüfung der Hypothese, daß Translation durch Exon α in Intron α/β hinein stattfindet zur Synthese des 42 000 d Produktes (und durch α + β + γ in Intron γ/δ zur Synthese des 36 000 d Produktes) heranziehen. Sie zeigen, daß 1. neue Polypeptide von Intronmutanten Translationsprodukte von COB-Transkripten sind,

2. die Translation mit (einer) Apocytochrom b kodierenden Sequenz (en) beginnt und in das mutierte Intron hinein fortgesetzt wird,

3. die Translation in diesem Intron früher oder später beendet wird, wobei kürzere oder längere Polypeptide entstehen.

Angewendet auf das Intron α/β bedeutet es, daß die Trans-

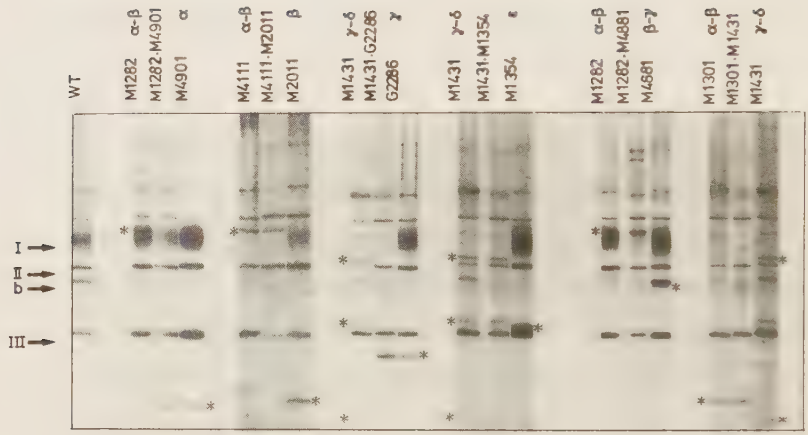


Abb. 12

Vergleich der mitochondrialen Translationsprodukte von Wildtyp, Doppel-Mutanten-$cob^-_x \cdot cob^-_y$ und den Ausgangsmutanten

Die Hefestämme wurden in Gegenwart von CHX mit $^{35}SO_4^{2-}$ markiert, die Mitochondrien isoliert, suspendiert und in 10-15% Polyacrylamidgradienten SDS-Gelelektrophoresen fraktioniert. Die Autoradiogramme zeigen das Bandenmuster des Wildtyps ganz links, so wie diejenigen der Doppel-Mutanten $cob^-_x \cdot cob^-_y$, jeweils flankiert von den entsprechenden Einfachmutanten, aus denen sie hervorgingen. Die dazugehörigen Mutationsorte sind oberhalb eingetragen. Pfeile weisen die Positionen von UE I, II, III der Cytochrom c Oxidase und von Cytochrom b aus. Sternchen markieren neue Banden der Einzelmutanten, die teilweise auch in den Doppel-Mutanten $cob^-_x \cdot cob^-_y$ zu finden sind; Dreiecke bezeichnen das 42 000 d Protein. Durch den stammbedingten genetischen Unterschied im Kern weicht der Proteinhintergrund der Doppel-Mutanten $cob^-_x \cdot cob^-_y$ etwas von dem der Einzelmutanten ab.

lation im α-Bereich beginnt und entweder gleich zu Beginn des Introns α/β beendet wird (15 000 d Produkt) oder bis zu einem anderen frühen Stopcodon der 42 000 Bande weitergeht (18 000 d, ...) wie bei Mutante M4111. Das Intron α/β ist also nicht aus dem Transkript entfernt worden, wie es zur Translation des Cytochrom b nötig ist. Dies gilt entsprechend für die anderen Introns.

In allen Kombinationen zweier Mutanten, von denen eine die UE I der Cytochrom c Oxidase verloren hat, ist dieser BOX-Phänotyp epistatisch; die Doppel-Mutante-cob^-_x . cob^-_y zeigt keine UE I mehr. Falls durch Leakyness oder Temperatursensibilität noch geringe Mengen von Cytochrom b in den Einfach-Mutanten gebildet wurde, so verschwindet dies nun völlig, die Doppelmutanten sind "dicht".

4.3. Kombinantion von zwei Intron-Mutanten

In weiteren Experimenten wurde die Frage nach Epistasie einer Intronmutante über eine zweite Intronmutante geprüft. Doppel-Mutanten, die Mutationen aus zwei verschiedenen Introns enthielten, wurden in den Kombinationen α/β . β/γ und α/β . γ/δ hergestellt und ihre Syntheseprodukte untersucht (siehe Abb. 12). Wie bereits in den vorher besprochenen Fällen von Exon . Exon und Exon . Intron Mutanten prägt auch hier die jeweils erste Mutation in Leserichtung das Peptidmuster der Doppel-Mutanten Intron . Intron. Im gezeigten Beispiel bewirken beide kombinierte Mutationen im Wesentlichen das Bandenmuster der einfachen α/β - Mutante. Die Epistasie der in Translationsrichtung ersten Mutation über die zweite ist klar zu erkennen. Die Interpretation dieser Befunde erfolgt im Zusammenhang mit den Daten über das Prozessing der RNS, die zur Abrundung und

besseren Verdeutlichung der bisher allein auf genetischen und protein-biochemischen Daten beruhenden Analysen der COB-Region in die folgende Diskussion mit einbezogen werden.

D. Diskussion

Die COB-Region von Saccharomyces cerevisiae zeichnet sich unter den vielen bekannten Mosaikgenen (Bernardi 1978; Gilbert 1978; Blake 1978; Crick 1980; Lewin 1980) durch zwei Besonderheiten aus: 1. Es ist das zuerst bekannt gewordene Proteinkodierende Split-Gen in einem nicht typisch eukaryonten System. 2. Es sind eine Vielzahl von Mutationen sowohl in Strukturgen-Sequenzen als auch in "Intervening"-Sequenzen lokalisiert worden. Die beschriebenen Wirkungen dieser Mutationen auf das vermutlich in der COB-Region kodierte Protein des MG 30 000 d, bei dem es sich um Cytochrom b handeln sollte, waren derart, daß eine systematische Analyse einer großen Serie von Mutanten Ergebnisse erwarten ließ, die 1. die Genorganisation erkennen und 2. die Funktion der durch Mutationen gekennzeichneten Sequenzen charakterisieren sollten.

1. Die COB Region enthält das Strukturgen für Apocytochrom b

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden 134 cob^--Mutationen kartiert und ihre Wirkungen auf die Synthese mitochondrialer Genprodukte durch Gelelektrophorese radioaktiv markierter Proteine, kombiniert mit immunologischen Verfahren, bestimmt. Vorarbeiten an kleineren Serien von cob^- und oxi^-Mutanten (Cabral et al. 1978; Tzagoloff et al. 1976; Haid 1979) hatten gezeigt, daß mit^- Mutationen vielfach zu Molekulargewichts-Änderungen des in der jeweiligen Region kodierten Proteins führten, deren Ursache in frühzeitiger Termination der Proteinsynthese an non-sense Kodons vermutet wurde. Im gleichen COB-Abschnitt kartieren zudem diverse Mutationen, die zur Resistenz gegen Inhibitoren des Elektronenflusses im bc_1-Komplex führen (Colson und Slonimski 1979).

Die Untersuchungen, die mit den von Claisse et al. 1978 (und Haid 1979) an nur 22 mit$^-$-Mutanten vorgenommenen übereinstimmen, von denen fünf Mutanten neue Banden steigenden Molekulargewichts zwischen 13 400 bis 26 600 d aufweisen, wurden hier auf 134 ausgedehnt. Davon zeigen 48 Mutanten im SDS-Gel den - mehr oder weniger vollständigen - Verlust von Cytochrom b, MG 30 000 (im Polyacrylamid-Gradienten-SDS-Gel) und gleichzeitig eine neue Bande niedrigeren Molekulargewichts. Punktmutationen (nonsense oder frame-shift Mutation) sind die Regel, da fast alle Mutanten relativ leicht revertieren, (Rate $> 1 \times 10^{-7}$) was größere Deletionen ausschließt.

Erstmals wurde durch die vorliegenden Untersuchungen gezeigt, daß alle neuen Banden mit Antiserum gegen Cytochrom b präzipitierbar sind. Die neuen Banden, die dem Wildtyp-Cytochrom b am ähnlichsten sind (siehe unten), liegen im Bereich ε in Größen zwischen 30 500 und 22 500 d. Darauf folgt die Serie der 22 000 bis 21 000 d Produkte im Bereich δ, als nächstes die von 19 500 bis 16 000 in γ. Die neuen Banden im Bereich β weisen Größen von 15 000 auf, deren Vorläufer in α von 14 000 bis runter zu 8 000 d aufgefunden wurden. Diese relativ kleinen Polypeptide wurden mit Gewissheit erst nach Antikörper-Präzipitation entdeckt, da bei alleiniger Betrachtung aller markierter mitochondrial synthetisierter Proteine, vermutlich durch die geringe Proteinmenge, nur Banden vom MG 12 000 d an aufwärts zu erkennen waren. Noch kürzere Produkte aus den ersten vier Klustern der α-Region waren mit den verwendeten Methoden nicht zu entdecken.

Auf Grund der kontinuierlichen Zunahme der Fragmentgrößen innerhalb der einzelnen Bereiche α bis ε und von einem Bereich zum nächsten, der Studien an Exon . Exon-Doppelmutanten und der hier erstmals beschriebenen Reaktion mit Serum gegen Apocytochrom b

kann mit Sicherheit festgestellt werden, daß es sich bei den neuen Fragmenten um Teile des gleichen Polypeptids Apocytochrom b handelt. Daraus folgt, daß die Orte dieser Fragmente bedingenden Mutationen in Apocytochrom b - kodierenden Sequenzen liegen. Die Ergebnisse, die Haid et al. 1979, bezüglich gleichen, ungewöhnlichen Laufverhaltens bei verschiedenen Polyacrylamidkonzentrationen (freie elektrophoretische Mobilität) und durch Vergleich der Peptidmuster nach partieller proteolytischer Verdauung von Cytochrom b und dem Fragment erhielt, gaben erste Hinweise auf einen solchen Zusammenhang. Es bleibt die Frage, welche Sequenz den Polypeptidanteil bis 8 000 d kodiert. Folgt man der Reihe von ε bis α abnehmender MG der Apocytochrom b Fragmente, so erwartet man ihre Fortsetzung zu Fragmenten unter 8 000 d bei Mutanten der ersten vier Kluster der COB-Region. Ihr Phänotyp unterscheidet sich von den Mutanten der folgenden Kluster nur durch die Abwesenheit eines Fragmentes. Es erscheint daher wahrscheinlich, daß kleinere Produkte als 8 000 d in einem Teil dieser Mutanten gebildet werden, jedoch bisher aus verschiedenen Gründen nicht auffindbar sind. Eine Größenabschätzung nach Rekombinationshäufigkeiten macht wahrscheinlich, daß alle Mutationen der ersten 10 Kluster (α) innerhalb einer Sequenz von ca 500 bp liegen, welche zur Kartierung der NH_2-terminalen Hälfte von Apocytochrom b (1-14 000 d) ausreicht. Inwieweit Mutationen in dem 5'-nicht translatierten Leader lokalisiert sind, ist bei der verwendeten Methodik nicht festzustellen. Die klare Korrelation einer langen Reihe zunehmender Fragmentlängen mit der Reihenfolge der entsprechenden Mutationen rechtfertigt die Annahme vorzeitiger Termination der Transkription an non-sense Kodons (entweder direkt oder nach frame-shift). Dies definiert die Transkriptionsrichtung als von OLI 2 nach OLI 1

verlaufend. Sie steht im Einklang mit der Transkriptionsrichtung aller (mit der Ausnahme einer seltenen $tRNS^{thr}$, Li und Tzagoloff, 1979) bisher daraufhin untersuchten Gene: OXI I (Weiss-Brummer et al. 1979)., 21 S RNS, $tRNS^{cys, his}$, OLI I, 15s RNS (Grivell et al. 1979). Entsprechend wird von Grivell et al. die Möglichkeit diskutiert, daß eine einzige Transkriptionsrunde für die koordinierte Genexpression aller mitochondrialer Gene genügen sollte oder aber nur wenige "polycistronische" Transkripte gebildet werden.

In das oben geschilderte Kolinearitätsmuster fügen sich einige cob^--Mutanten scheinbar nicht ein:

1. Mutante M4901, die im 9. Cluster des **a** Bereichs kartiert wurde, zeigt ein Fragment von 15 000 d; M511 im gleichen Kluster hat jedoch nur ein Polypeptid von 13 000 d. Da im 10. Kluster kartierte Mutanten Produkte von 14 000 d bilden, scheint die Kolinarität durch das 15 000 d Produkt gestört zu sein. Nimmt man an, daß es sich bei den anderen Mutationen um Basenaustausch handelt, der zum direkten Kettenabbruch in der Proteinsynthese führt (non-sense), so ist die Mutation der Mutante M4901 vorraussichtlich durch frame-shift entstanden, was erst einige Tripletts weiter zum Stopcodon führt.

2. Die in allen codierenden Sequenzen auftretenden Mutanten, die zwar atmungsdefekt sind, aber nach radioaktiver Markierung dennoch eine Bande vom MG 30 000 im Autoradiogramm aufweisen. Im Exon **a** sind dies M7622 und M871, in **γ** M4410 und M4721, in **δ** M741 und in **ε** M4615. Vermutlich enthalten diese Polypeptide durch missense-Mutation eine falsche Aminosäure, die zwar noch die Bildung des Polypeptids ermöglicht, die Funktionsfähigkeit jedoch aufhebt. Daraufhin weist auch die Veränderung des Cytochrom b der Mutante M4721, bei der die Absorptionslinie im Vergleich zum Wildtyp

um 1,5 nm nach Rot verschoben ist. Die Ursache, weshalb so wenige missense Mutanten gefunden wurden, liegt im dunkeln; es mag am verwendeten Mutagen, an der Art der Mutantenselektion oder an Besonderheiten der Basensequenz in der COB-Region und des proteinsynthetisierenden Systems der Hefemitochondrien liegen.

3. Die Mutanten M1231, M1624, M551, M5005 alle im Bereich α gefunden, zeigen kein neues Produkt, obwohl ihnen Cytochrom b fehlt. Die erwarteten neuen Peptide sollten alle zwischen 8 000 und 14 000 d liegen. Möglicherweise werden diese recht kurzen Polypeptide, die entweder durch eine Non-sense Mutation vorzeitig beendet oder durch eine missense Mutation verändert sind, nicht fest in die Mitochondrien-Membran integriert oder/und vorzeitig abgebaut. Sie könnten deshalb nicht in Präzipitationen entdeckt werden, die hauptsächlich aus submitochondrialen Partikeln bestehen. In den längeren Abschnitten α, γ und ε wurden jene Mutationsorte lokalisiert, die zur Resistenz gegen die Inhibitoren des bc_1 Komplexes führen (Pratje und Michaelis 1977; Colson und Slonimski 1977, 1979; Colson et al. 1979). Sie können deshalb als Veränderungen der Primärstruktur des Cytochrom b erklärt werden.
Die kodogenen Bereiche α bis ε sind in Abb. 13 in ihrer ungefähren Größe, errechnet aus den Längen der auftretenden Fragmente im Vergleich zur Gesamt-COB-Region angegebenen (Grosch et al. 1981). Sie sind im Verhältnis zur Gesamtlänge der DNS dieser Region relativ kurz, Mutationen darin jedoch häufig, 71 von 134 getesteten. Diese große Mutationshäufigkeit ist ebenfalls ein Hinweis auf einen Strukturgenbereich.

Während der Niederschrift dieser Arbeit wurde von Nobrega und Tzagoloff 1980, die DNS-Basensequenz der COB-Region er-

mittelt. Dadurch konnten die genauen Längen der einzelnen Exon- und Intronbereiche festgestellt werden, sowie die zugehörigen MG der Proteinanteile, die demnach bis zu 30 % höher sind, als die im SDS-Gel errechneten Werte.

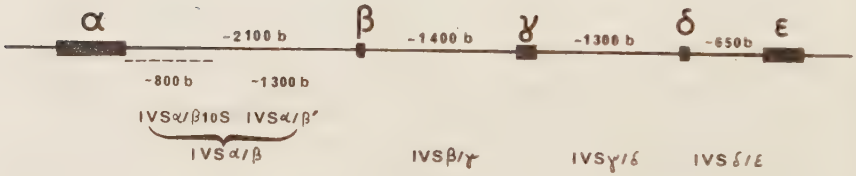


Abb. 13

Physische Karte der COB-Region nach Bechmann et al. 1980

Eingetragen sind die kodogenen Bereiche α bis ε entsprechend den Längen der von den hier liegenden Mutanten gebildeten Fragmenten von Cytochrom b. Die Längen (Angaben in Basen) der Intron Sequenzen (IVS) wurden mit Hilfe von Restriktionsfragmenten und Hybridisierung ermittelt (Grosch et al. 1981 , siehe auch entsprechende Längenangaben für den Hefestamm Kl14-4A von Van Ommen et al. 1980).

2. Translation von Intron-Sequenzen des Mosaikgenes COB

Wie durch Rekombinationsstudien erkennbar (Slonimski et al. 1978 a; Haid et al. 1979) und durch physische Kartierung belegt, trennen lange Nukleotidsequenzen die Apocytochrom b kodierenden Sequenzen α, β, γ, δ und ε (siehe Abb. 13). Erstere werden als Introns bezeichnet. Sie haben keine Bedeutung für die Kodierung des Proteins Apocytochrom b. Jedoch scheint ihre intakte Basensequenz für die Expression der COB-Region von Wichtigkeit zu sein, da eine große Anzahl von cob⁻-Mutationen in diesen Intronbereichen genetisch lokalisiert wurde: Im Intron α / β in 10 Klustern 36 Mutationsorte, im Intron β / γ in zwei Klustern 8 Mutationsorte und im Intron γ / δ in vier Klustern 21 Mutationsorte. Im Intron δ / ε wurden bislang keine Mutationsorte registriert.

Die Mutanten der Intronsequenzen zeigen einige gemeinsame Charakteristika: Etwa 35 % sind "leaky" oder temperatursensibel, d.h. sie vermögen bei bestimmten Temperaturen auf nicht vergärbarem Substrat zu wachsen, wenn auch langsamer als der Wildtyp. Werden Intron-Mutanten (gegebenenfalls bei nicht permissiver Temperatur) mit $^{35}SO_4^{2-}$ markiert und die aufgetrennten Proteine analysiert, so fehlt die Apocytochrom b-Bande vom (im SDS-Gel bestimmten) MG 30 000 d. Gleichzeitig zeigen ca. 90 % der Mutanten keine Bande der UE I der Cytochrom c Oxidase, bzw. sie ist in ihrer Intensität stark reduziert. Die Ergebnisse decken sich mit den Tieftemperatur-Cytochromspekten der Mutanten: Es fehlen die Maxima für Cytochrom b und Cytochrom aa_3.

Anders als die Exon-Mutanten, die jeweils eine neue Bande im Gelmuster aufweisen, wurden bei Intron-Mutanten mehrere, meist drei, neue Banden gleichzeitig entdeckt. Die Produkte sind jeweils länger, als das der letzten vorausgegangenen Exon-Mutante. Alle neuen Produkte - mit Ausnahme einer Serie in γ / δ -Mu-

tanten - sind mit Antikörpern gegen Apocytochrom b präzipitierbar. Daraus ist zu schließen, daß alle neuen Banden der Intron-Mutanten zumindest Anteile von Apocytochrom b enthalten und deshalb Translationsprodukte der COB-Region sind. Um die unterschiedlich langen neuen Polypeptide zu erklären, muß postuliert werden, daß auch (Teile von) Intronsequenzen translatiert werden. Dies könnte beim Durchlesen von Exon- in Intron-Sequenzen an Precursor-Apocytochrom b-mRNS geschehen.

Betrachtet man die einzelnen Mutanten der Introns β / γ und γ/δ genauer, so stellt sich heraus, daß die Mutationsorte alle eng gekoppelt nahe den Cytochrom b kodierdenden Sequenzen β, γ oder δ liegen (Grosch et al. 1981). Die neuen Produkte vom MG 15 000, 16 000 und 19 000 (vergl. Ergebnisse, Tabelle 2) der β/γ Mutanten reagieren alle mit Antiserum gegen Apocytochrom b. Eine kräftige Fällung bei den γ/δ Mutanten ergeben nur die Banden vom MG 23 000 und 36 000. Sehr schwach ist auch eine Bande von 20 000 d erkennbar. Durch Hineinlesen der Ribosomen am nicht fertig prozessierten Messenger würde bei einem Überlesen der Exon/Intron-Grenze um rund 30 bp ein Protein entstehen, daß 10 Aminosäuren länger ist, als das der letzten Exonmutanten, hier 16 000 d und 20 000 d in β/γ und γ/δ ; beim Weiterlesen um 100 bp bzw. 30 Aminosäuren entständen die Banden von 19 000 für β/γ und 23 000 für γ/δ . Eine entsprechende Abstufung ergibt sich auch für die anschließend besprochenen α/β - Mutanten. Ob diese Systematik zwangsläufig beim Prozessing des Messengers entsteht oder rein zufällig ist, bleibt offen.

Das mit Apocytochrom b-Antiserum präzipitierbare 36 000 d Produkt des Introns γ/δ ist ebenfalls durch Translation von $\alpha + \beta + \gamma +$ Teile von Intron γ/δ zu erklären, da die Intron-

Sequenz γ / δ einen entsprechend langen RNS- (DNS-) Bereich umfaßt (Abb. 13). Polypeptide der Größen zwischen 23 000 d und 36 000 d, die mit Antikörpern reagieren, treten nicht auf, es läßt sich keine Serie kontinuierlich zunehmender Fragmente eines Endproduktes (vielleicht 36 000 d) erkennen.
Die neue Bande von 28 000 d bzw. 12 000 d, die in den Auftrennungen der gesamten mitochondrialen Proteine aller γ / δ - Mutanten deutlich sichtbar ist, reagiert nicht mit Serum gegen Apocytochrom b. Ihre Synthese erfolgt möglicherweise nur an reinen Intronsequenzen. Eine andere Erklärung wäre, daß sich durch die Mutation die Konformation der 12 000 d bzw. 28 000-d-Produkte derart geändert hat, daß die Apocytochrom b-homologen Sequenzen nicht mehr erkannt werden.

Die Intronsequenz δ / ε ist mit etwa 650 Basen (Abb. 13) die kürzeste der COB-Region. Phänotypisch erkennbare Mutationen in dieser Sequenz fehlen bisher. Die Existenz dieses Introns wird durch die genetischen Daten von Haid et al. 1979, Alexander et al. 1980, und Slonimski et al. in Vorbereitung, belegt und durch die elektronenoptische Hybridisierungsdaten von Van Ommen et al. 1979 ergänzt, die bei der Paarung von Cytochrom b mRNS mit DNS der COB-Region Schleifen von ungepaarter DNS als Introns erkennen lassen.

Das 42 000 d Produkt des Introns α / β : Der Abschnitt der COB-Region, der zwischen den (Teile von) Cytochrom b kodierenden Bereichen α und β liegt, zeigt gleichzeitig typische Merkmale für 1. eine kodogene Region: verkürzte Polypeptide zunehmender Länge des Endproduktes durch Kettenende-Mutation, funktionsloses

Protein der nativen Länge durch Miss-sense Mutation, Reaktion dieser Polypeptide mit entsprechenden Antikörpern und 2. Merkmale einer Intron Region: multiple neue Banden im SDS-Gel, Temperatursensibilität, gleichzeitiger Verlust von Cytochrom b und Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase. Verfolgt man die Längen neu gebildeter Polypeptide der Mutanten in der Reihenfolge der kartierten Mutationsorte von Exon β aus in Richtung α und beobachtet speziell die größte der mit Antikörpern gegen Apocytochrom b reagierenden Banden, so findet man zuerst Mutanten, die ein Produkt von 42 000 d bilden, d.h. das 42 000 d Protein ist das Endprodukt dieses Introns. Dabei wird vorausgesetzt: die Mutationsorte verteilen sich etwa gleichmäßig über das gesamte Intron. Nach Rekombinationsdaten, die eine Kopplung der Marker des Introns untereinander und zum benachbarten Exon β zeigen, ist dies der Fall. Als vorzeitig beendete Fragmente des 42 000 d Produkts lassen sich die folgenden neuen Banden mit Molekulargewichten von 41 000 kontinuierlich abnehmend über 40, 39, 38, 35, 34 000 ... bis 15 000 d bezeichnen (Tabelle 2). Die anschließenden Mutationsorte, die nach genetischen Daten zu urteilen, relativ weit voneinander entfernt liegen, bedingen alle eine neue Bande vom einheitlichen MG 15 000 d. Sie bilden damit eine Unterbrechung der Serie abnehmender MG der Polypeptide.
Bei der Suche nach der Fortsetzung der Serie abnehmender MG des 42 000 d Produktes unter 15 000 d stößt man zwangsläufig auf die Fragmente der Mutanten für Apocytochrom b des Exons α . Diese bilden von 14 000 bis 8 000 d kontinuierlich kleiner werdend die Vorläufer der Polypeptide größer 15 000 d. Die Mutanten der ersten vier Kluster in α , bei denen keine neuen Banden gefunden wurden, müßten somit als erste Vorläufer der Serie angesehen werden. Dieser DNS-Bereich würde das N-terminale Ende des

42 000 d Proteins kodieren. Zwar wäre es auch denkbar, daß die Anfangssequenz mit Fragmenten kleiner als 15 000 d des 42 000 d Proteins irgendwo anders auf dem Genom kodiert ist. Dagegen stehen folgende Befunde: 1. Die Proteine haben mit dem Apocytochrom b gemeinsame antigene Sequenzen, 2. allen α -Mutanten fehlt im SDS-Gel die Bande vom MG 42 000 d, die alle anderen Mutanten der kodogenen Bereiche β, γ, δ und ε aufweisen, 3. bei Exon α · Intron α/β -Doppel-Mutanten verhindert eine Kettenende Mutation im Exon die Expression der für die Intron-Mutation typischen Proteine, 4. fehlt vielen α Mutanten die UE I der Cytochrom c Oxidase, wie für Intron α/β -Mutanten typisch. In Abbildung 14 sind in der unteren Hälfte die meisten der aus Tabelle 2 ersichtlichen neuen Produkte von Exon α und Intron α/β -Mutanten als horizontale Striche in Korrelation zur Lage der Mutationsorte eingetragen. Zum Vergleich ist oberhalb das auf identische Art und Weise erstellte Modell für Cytochrom b selbst aufgezeigt. Aus dieser Abbildung geht hervor, daß die COB-Region die Information zur Bildung von zwei Proteinen enthält:

1. Cytochrom b, MG 30 000 d,
2. ein Protein etwa der Größe von 42 000 d.

Beide Proteine haben die gleiche Anfangssequenz an Aminosäuren bis zum MG 14 000 d. Liegt eine Mutation in den Sequenzen α oder α/β vor, so führt diese entweder zu einem vorzeitigen Kettenabbruch und daher verkürzten Fragmenten des 42 000 d Proteins, wie in Abb. 14 an vielen Mutanten belegt, oder zu einem Einbau einer falschen Aminosäure, die das Protein funktionslos macht, ohne seine Länge zu verändern, in Tabelle 2 als + in der Spalte des 42 000 d Proteins angegeben.

Das 42 000 d Protein wird an einer COB-RNS translatiert, die noch die kodierenden Teile des Introns α / β enthält. Eine Korrelation der hier vorgelegten Daten mit der Akkumulation von Transkripten der COB-Region (Haid et al. 1980; Schmelzer et al. 1981) zeigt, daß der Messenger für das 42 000 d Protein durch Excision des α-nahen Teils (α / β 10S) der Sequenz α / β aus dem Gesamt-COB-Transkript gebildet wird, also aus der Sequenz α , dem Rest von α/β (α / β ') und den nachfolgenden Exons und Introns besteht. Die Sequenz α / β 10S (ca. 800 bp) ist also als Intron im "Gen" für das 42 000 d Protein aufzufassen. (Nach Erstellung des Roh-Manuskripts wurde von Borst und Grivell 1981, eine Veröffentlichung entsprechenden Inhalts publiziert).

Jacq et al. 1980 und Lazowska et al. 1980, veröffentlichten die von ihnen ermittelte DNS-Basensequenz dieser Region. Sie finden einen offenen Leserahmen in α und im zweiten Teil von α / β , nicht jedoch in der IVS α /β 10S, die 765 Nukleotide lang ist. Durch Herausnehmen der IVS α / β 10S entsteht eine Sequenz, die vom Anfang der Sequenz α bis kurz vor Ende von α/β ' im gleichen Raster translatiert werden kann. Dies ist ausreichend für ein 42 000 d Protein.

Da Mutationen außerhalb α + α / β ' nicht in 42 000 d-Protein-kodierenden Sequenzen liegen, müßte bei allen Mutanten im Bereich β bis ε das Protein zu finden sein. Dies ist tatsächlich der Fall, wenn auch oft in recht geringen Mengen und erst nach längerer Exposition der Gele nach Antikörperpräzipitation. Die beiden Mutaten M7-40 und M13-101 zeigen keinerlei Bande im Bereich 42 000 d. Da sie aus Tzagoloffs Kollektion stammen und der entsprechende Wildtyp weder Intron α/β noch Intron β / γ enthält, kann er kein 42 000 d Protein bilden. Schwierig

gestaltete sich der Nachweis für das Protein beim Wildtyp: Das Verhältnis von Cytochrom b zu 42 000 d Protein ist so groß, daß erst nach einem präparativen SDS-Gel zur Abtrennung von Cytochrom b in der anschließend durchgeführten Immunpräzipitation mit dem Eluat des Bereichs um 42 000 d und Auftrennung des Präzipitats ein eindeutig positiver Nachweis gelang (Grivell pers. Mitteilung).

Maturase Funktion des 42 000 d Proteins

Mutationen im Kodierungsbereich α + α/β des 42 000 d Proteins bedingen die Unfähigkeit der Zellen auf nicht vergärbarem Substrat zu wachsen. Welche Funktionen werden auf molekularer Ebene von diesen Mutationen gestört?
Die Hybridisierungsdaten von Haid et al. 1980, und Schmelzer et al. 1981, zeigen, daß an Stelle des Messengers für Apocytochrom b der Größe 18S (im Wildtyp) längere Transkripte in den Mitochondrien der Mutanten angereichert werden. Das Processing des primären COB-Transkriptes wird durch die Mutationen verhindert. Liegen solche im Bereich des ersten Teils der α/β - Region (IVS α/β 10S), so verhindern sie das Processing dieser Sequenz 10S. Die Ribosomen vermögen nur Polypeptide der Exonsequenz α zu translatieren, es entstehen Fragmente der Länge 15 000 d, gleich lang für alle (Processing)-Mutanten im Intron α/β 10S. Diese Mutationen verhindern damit nicht nur die Synthese von Apocytochrom b, sondern auch die des 42 000 d Proteins, daß erst nach Entfernung der 10S-Sequenz translatiert werden kann. Liegen Mutationen in der Sequenz α/β ', die neue Fragmentlängen des 42 000 d Proteins zwischen 15 000 d und 42 000 d zulassen, ohne das intakte Protein zu ermöglichen, so stellt sich bei der Analyse der Hybridisierungsdaten heraus, daß nur die

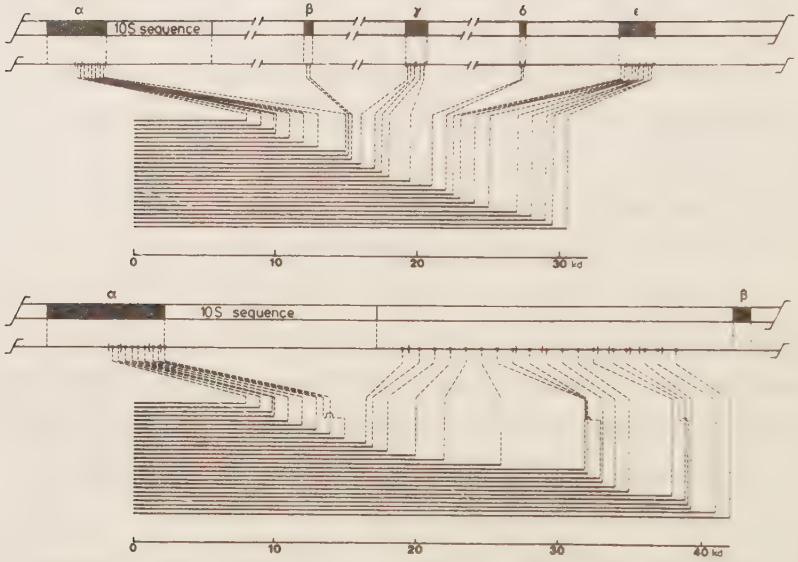


Abb. 14

Schematische Darstellung des Kodierungsgehaltes der COB-Region

Im oberen Teil der Abbildung ist die gesamte COB-Region mit den Exon-Bereichen α, β, γ, δ und ε für die Synthese von Apocytochrom b dargestellt. Die Mutationsorte wurden durch gestrichelte Linien mit dem Fragmentende in Kilo-Dalton (kd) der in SDS-Gelen gefundenen neuen Banden korreliert, die als horizontale Linien eingetragen sind. Für Apocytochrom b wurde ein MG von 30 kd angenommen.
Der untere Teil der Abb. zeigt die Kodierungsregion für das 42 000 d Protein im Exon α und Intron α/β . Mutationsorte im gleichen Kluster wurden in Klammern gesetzt, da ihre genaue Reihenfolge nicht genetisch ermittelt wurde.

10S-Sequenz des primären Transkripts entfernt wurde. Die Intron-Sequenz α / β ' ist im Transkript verblieben, ein weiteres Processing in Richtung COB-mRNS findet nicht statt. Mutationen in α (soweit sie nicht temperatursensibel sind) gestatten ebenso nur die Excision des α / β 10S-Bereichs aus dem Transkript, nicht jedoch die der Sequenz α / β ' und verhindern dadurch jedes weitere Processing. Da Mutationen in beiden Sequenzen, die an der Synthese des 42 000 d Proteins beteiligt sind (α und α / β ' und indirekt Mutationen in α / β 10S) des Processing dieses α / β ' -Bereiches verhindern, liegt die Versuchung nahe, das 42 000 d Protein (oder Teile davon) bewirkt selbst oder vermittelt z.B. durch Anlagerung an die RNS, an der es synthetisiert wurde, das Prozessing des Introns α / β '. Nur wenn das 42 000 d Protein in gesamter Länge und ohne Basenaustausch als intaktes Protein an der Prekursor-RNS der COB-Region synthetisiert wurde, ist es in der Lage, seine Funktion beim Processing des Bereiches Intron α / β ' zu erfüllen. Es entfernt dabei (Teile) die eigene Synthesesequenz aus der RNS, kann deshalb an der gleichen RNS selbst nicht mehr nachgebildet werden, sondern verhilft zum schnellen und exakten Herstellen des Messengers für Apocytochrom b. Da anscheinend wenige Moleküle des 42 000 d Proteins für diese Aufgabe ausreichen, wurde es bei bisherigen Analysen mitochondrialer Proteine nicht entdeckt. Von Slonimski (Lazowska et al. 1980) wurde schließlich, nach Kenntnis eines Teiles der Nukleotid-Sequenz der Begriff "Maturase" geprägt, Proteine, die Hilfestellung beim Prozessieren der RNS leisten. Diese Proteine enthalten einen hohen Prozentsatz an hydrophoben Aminosäuren, die sich leicht an die RNS anlagern sollen. Die Maturasen sollen, wie das 42 000 d Protein der COB-Region, die RNS-Bereiche erkennen, an denen sie gebildet wurden und zum

richtigen Prozessing beitragen.

Zwar ist die Idee auf die Intron-Sequenz α / β ' übertragbar, aber nicht direkt auf die anderen Introns der COB-Region. Entweder müßte

a) in jedem Intron für das eigene Intron ein anderes Maturase-Molekül synthetisiert werden; es wurden aber bisher in der COB-Region nicht in allen Introns translatierbare Sequenzen gefunden;

b) ein Maturase-Molekül verschiedene Introns erkennen; das Prozessing sollte dann aber vollständig ablaufen, wenn das 42 000 d Protein intakt ist oder garnicht, wenn es defekt ist. Diese Möglichkeit wird durch die DNS-RNS-Hybridisierungsdaten ausgeschlossen, denn es treten alle Prozessing-Zwischenstufen mit 1, 2, 3 oder 4 zurückbehaltenen Introns auf, je nachdem welche Mutante betrachtet wird;

c) bei den Hefestämmen von A. Tzagoloff müsste ein anderes Protein als Maturase benutzt werden, da das Intron α/β im Gel nicht enthalten ist.

Ein Einfluß der Maturase-Funktion des 42 000 d Proteins auf andere COB-Bereiche als den der eigenen Synthese ist nicht gefunden worden, jedoch korreliert das Auftreten des box-Phänotyps auffällig mit An- oder Abwesenheit dieses Proteins. Die aus vielen Exon- und Intronsequenzen zusammengesetzte OXI III-Region, die als Codierungsort für die UE I der Cytochrom c Oxidase ermittelt wurde, könnte sich vielleicht des beweglichen 42 000 d Proteins als Maturase zum Prozessing der eigenen RNS bedienen. Solche Vermutungen bedürfen in nächster Zeit einer genauen Untersuchung.

E. Zusammenfassung

Die COB-Region der mitochondrialen DNS der Hefe Saccharomyces cerevisiae und die Syntheseprodukte dieses Mosaik-Genes wurden untersucht. Behilflich waren dabei 134 Mutanten, deren Mutationsorte unter Verwendung der Rekombinationskartierung und rho^- Deletionskartierung die COB-Region in 36 aufeinanderfolgende Kluster einteilt. Diese cob^--Mutanten zeigen spektroskopisch einen Ausfall des funktionsfähigen Cytochroms b, etwa 103 zusätzlich den von Cytochrom aa_3. Der Vergleich der Syntheseprodukte des Wildtyps mit denen der verschiedenen Mutanten führte zu folgenden Resultaten und Schlüssen:

1. Im Vergleich zum Wildtyp fehlt nahezu allen Mutanten das mitochondrial synthetisierte Polypeptid des MG 30 000 d, das durch Antikörperpräzipitation als Apocytochrom b identifiziert werden konnte.

2. Mutationen in fünf voneinander getrennten Bereichen (α bis ε) der COB-Region bedingen neue Polypeptide zwischen 8 000 und 30 000 d in 25 Zwischengrößen, die alle mit Serum gegen Apocytochrom b präzipitierbar sind. Sie sind durch vorzeitige Kettenende-Mutation der Translation als Fragmente des Apocytochrom b entstanden. Somit kartiert die COB-Region das Strukturgen für Apocytochrom b in Transkriptionsrichtung von OLI 2 nach OLI 1.

3. Zwischen den Strukturgenanteilen liegen Sequenzen, die nicht an der Kodierung für Apocytochrom b beteiligt sind und die COB-Region zu einem Mosaikgen machen.

4. Mutationen in den Intronsequenzen bewirken den Verlust von Apocytochrom b und oftmals gleichzeitig den der UE I der Cytochrom c Oxidase. Die von diesem Mutanten gebildeten neuen Polypeptide (MG von 12 000 bis 69 000 d) reagieren mit zwei Ausnahmen stets mit Serum gegen Apocytochrom b. Sie sind an Zwischenstufen-Trans-

kripten der COB-Region synthetisiert worden, wie aus Doppel-cob-Mutanten geschlossen werden kann.

5. Eine Serie von Mutationen, die neue Polypeptide in Größen zwischen 17 000 d und 42 000 d verursacht, liegt im ersten Intron (α/β) des Mosaikgenes für Apocytochrom b. Durch Mutationen an mindestens 14 verschiedenen Karten-Positionen verursachen die Mutanten vorzeitigen Kettenabbruch im C-terminalen Teil eines Polypeptids der Länge 42 000 d. Der N-terminale Teil wird durch die Exon-Sequenz α codiert und ist daher homolog demjenigen von Apocytochrom b. Die Translation des 42 000 d Polypeptids erfolgt am ersten Zwischenstufentranskript, beginnend mit dem Bereich α bis weit in den Bereich α/β hinein.

6. Die COB-Region stellt eine Sequenz überlappender Kodierung dar. Das erste Intron des Apocytochrom b Genes ist zugleich Exon für das 42 000 d Protein. Es wird erwogen, ob dem 42 000 d Produkt eine Funktion als Maturase beim Prozessieren des primären Transkriptes zukommen könnte.

F. Literaturverzeichnis

Alexander, N.J., Vincent, R.D., Perlman, P.S., Miller, D.H., Hanson, D.K. and Mahler, H.R.: Regulatory interactions between mitochondrial genes. I. Genetic and biochemical characterization of some mutant types affecting apocytochrome b and cytochrome oxidase. J. Biol. Chem. 254, 2471-2479 (1979)

Alexander, N.J., Perlman, P.S., Hanson, D.K. and Mahler, H.R.: Mosaic organization of a mitochondrial gene: Evidence from double mutants in the cytochrome b region of Saccharomyces cerevisiae. Cell 20, 199-206 (1980)

Avner, P.R., Coen, D., Dujon, B. and Slonimski, P.P.: Mitochondrial Genetics IV. Allelism and mapping studies of oligomycin resistant mutants in S. cerevisiae. Mol. Gen. Genet. 125, 9-52 (1973)

Backhaus, B., Schweyen, R.J., Kaudewitz, F. and Dujon, B.: On the Formation of rho^- petites in yeast. III. Effects of temperature on transmission and recombination of mitochondrial markers and on rho^- cell formation in temperature sensitive mutants of Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet. 161, 153-173 (1978)

Bandlow, W. and Schweyen, R.J.: Instability of the rho-factor in a temperature-sensitive mutant in yeast: Biochemical characterization of the mitochondrial mutant ts8. Z. physiol. Chem. 356, 220 (1975)

Bechmann, H., Haid, A., Schmelzer, C., Schweyen, R.J. and Kaudewitz, F.: Processing of the mRNA for apocytochrome b in yeast depends on a product encoded by an intervening sequence. In: Organization and expression of the mitochondrial genome (Kroon, A.M. and Saccone, C. eds.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, pp. 173-177 (1980)

Bernardi, G.: Intervening sequences in the mitochondrial genome. Nature 276, 558-559 (1978)

Blake, C.C.F.: Exons encode protein functional units. Nature 277, 598 (1979)

Borst, P.: Mitochondrial nucleic acids. Ann. Rev. Biochem. 41, 333-376 (1972)

Borst, P. and Grivell, L.A.: The mitochondrial genome of yeast. Cell 15, 705-723 (1978)

Borst, P. and Grivell, L.A.: One gene's intron is another gene's exon. Nature 289, 439-440 (1981)

Butow, R.A., Vincent, R.D., Strausberg, R.L., Zanders, E. and Perlman, P.S.: Genetic, physical and biochemical analysis of a mitochondrial gene. In: Mitochondria 1977 (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F. eds.) Walter de Gruyter - Berlin, pp. 317-335 (1977)

Cabral, F., Solioz, M., Rudin, Y., Schatz, G., Clavilier, L. and Slonimski, P.P.: Identification of the structural gene for yeast cytochrome c oxidase subunit II of mitochondrial DNA. J. Biol. Chem. 253, 297-304 (1978)

Claisse, M.L., Spyridakis, A. and Slonimski, P.P.: Mutations at any one of the three unlinked mitochondrial genetic loci BOX 1, BOX 4 and BOX 6, modify the structure of cytochrome b polypeptide(s). In: Mitochondria 1977 (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F. eds.) Walter de Gruyter - Berlin, pp. 337-344 (1977)

Claisse, M.L., Spyridakis, A., Wambier-Kluppel, M.L., Pajot, P. and Slonimski, P.P.: Mosaic organization and expression of the mitochondrial DNA region controlling cytochrome c reductase and oxidase. II - Analysis of proteins translated from the box region. In: Biochemistry and Genetics of Yeasts (Bacila, M., Horecker, B.L. and Stoppani, A.O.M., eds.) Academic Press, New York, pp. 368-390 (1978)

Claisse, M.L., Slonimski, P.P., Johnson, J. and Mahler, H. R.: Mutations within an intron and its flanking sites: patterns of novel polypeptides generated by mutants in one segment of the cob-box region of yeast mitochondrial DNA. Mol. Gen. Genet. 177, 375-387 (1980)

Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W. and Laemmli, U.K.: Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 252, 1102-1106 (1977)

Colson, A.M., TheVan, L., Convent, B., Briquet, M. and Goffeau, A.: Mitochondrial heredity of resistance to 3- (3,4-dichlorophenyl) - 1,1 - dimethylurea, an inhibitor of cytochrome b oxidation in Saccharomyces cerevisiae. Eur. J. Biochem. 74, 521-526 (1977)

Colson, A.M., Michaelis, G., Pratje, E. and Slonimski, P.P.: Allelism relationship between diuron-resistant, antimycin-resistant and funiculosin-resistant loci of the mitochondrial map in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet. 167, 299-300 (1979)

Colson, A.M. and Slonimski, P.P.: Mapping of drug resistant loci in the coenzyme QH_2 cytochrome c reductase region of the mitochondrial DNA map in Saccharomyces cerevisiae. In: Mitochondria 1977 (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F., eds.) Walter de Gruyter - Berlin, pp. 185-198 (1977)

Colson, A.M. and Slonimski, P.P.: Genetic localization of diuron- and mucidin-resistant mutants relative to a group of loci of the mitochondrial DNA controlling coenzyme QH_2-Cytochrom c reductase in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet. 167, 287-298 (1979)

Crick, F.: Split genes and RNA splicing. Science 204, 264-271 (1979)

Deutsch, J., Dujon, B., Netter, P., Petrochilo, E., Slonimski, P.P., Bolotin-Fukuhara, M. and Coen, D.: Mitochondrial genetics VI. The petite mutation in Saccharomyces cerevisiae: interrelations between the loss of the rho^+ factor and the loss of the drug resistance mitochondrial genetic markers. Genetics 76, 195-219 (1974)

Douglas, M.G. and Butow, R.A.: Variant forms of mitochondrial translation products in yeast: Evidence for location of determinants on mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 1083-1086 (1976)

Dujon, B., Slonimski, P.P. and Weill, L.: Mitochondrial genetics IX. A model for recombination and segregation of mitochondrial genomes in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 78, 415-437 (1974)

Dujon, B., Bolotin-Fukuhara, M., Coen, D., Deutsch, J., Netter, P., Slonimski, P.P. and Weill, L.: Mitochondrial genetics XI. Mutations at the mitochondrial locus ω affecting the recombination of mitochondrial genes in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet. 143, 131-165 (1976)

Faye, G., Fukuhara, H., Grandchamp, G., Lazowska, J., Michel, F., Casey, J., Getz, G.S., Locker, J., Rabinowitz, M., Bolotin-Fukuhara, M., Coen, D., Deutsch, J., Dujon, B., Netter, P. and Slonimski, P.P.: Mitochondrial nucleic acids in the petite colonie mutants: deletions and repetitions of genes. Biochimie 55, 779 (1973)

Gilbert, W.: Why genes in pieces? Nature 271, 501 (1978)

Goldring, E.S., Grossman, L.J., Krupnick, D., Cryer, D.R. and Marmur, J.: The petite mutation in yeast. Loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during inductions of petites with ethidium bromide. J. Mol. Biol. 52, 323-335 (1970)

Grivell, L.A. and Moorman, A.F.M.: A structural analysis of the oxi-3 region on yeast mtDNA. In: Mitochondria 1977 (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F., eds.) Walter de Gruyter - Berlin, pp. 371-384 (1977)

Grivell, L.A., Arnberg, A.C., de Boer, P.H., Borst, P., Bos, J.L., van Bruggen, E.F.J., Groot, G.S.P., Hecht, N.B., Hensgens, L.A.M., van Ommen, G.J.B. and Tabak, H.F.: Transcripts of yeast mitochondrial DNA and their processing. In: Extrachromosomal DNA. ICN-UCLA Symp. on Molecular and Cellular Biology, Vol 15 (Cummings, D., Borst, P., Dawid, I., Weissman, S. and Fox, C.F., eds.) Academic Press, New York, pp. 305-324 (1979)

Groot, G.S.P., Grivell, L.A., van Harten-Loosbroek, N., Kreike, J., Moorman, A.F.M. and van Ommen, G.J.B.: The role of the mitochondrial inner membran. In: Structure and Function of Energy-Transducing Membranes (van Dam, K. and van Gelder, B.F., eds.) Amsterdam: North-Holland, (1978)

Grosch, G., Schmelzer, C. and Mathews, S.: Physical map of the COB region in mitochondrial DNA of Saccharomyces cerevisiae. Current Genetics 3, 1-7 (1981)

Haid, A.: Der Codierungs-Gehalt der COB-Region der mitochondrialen DNS von Saccharomyces cerevisiae. Dissertation des Fachbereichs Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (1979)

Haid, A., Schweyen, R.J., Bechmann, H., Kaudewitz, F., Solioz, M. and Schatz, G.: The mitochondrial COB region in yeast codes for apocytochrome b and is mosaic. Eur. J. Biochem. 94, 451-464 (1979)

Haid, A., Grosch, G., Schmelzer, C., Schweyen, R.J. and Kaudewitz, F.: Expression of the split gene COB in yeast mtDNA. Mutational arrest in the pathway of transcript splicing. Current Genetics 1, 155-161 (1980)

Handwerker, A., Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F.: Evidence for an extrakaryotic mutation affecting the maintenance of the rho factor in yeast. J. of Bacteriol. 113, 1307-1310 (1973)

Jacq, C., Lazowska, J. and Slonimski, P.P.: Sur un nouveau mécanisme de la régulation de l'expression génétique. Comp. Rend. Hebd. Seances Acad. Sci. Série D. Sci. Nat. 290, 89-92 (1980)

Kessler, S.W.: Cell membrane antigene isolation with the Staphylococcal protein A-antibody adsorbent. J. Immunol. 117, 1482-1490 (1976)

Kotylak, Z. and Slonimski, P.P.: Joint control of cytochromes a and b by a unique mitochondrial DNA region comprising four genetic loci. In: The Genetic Function of Mitochondrial DNA (Saccone, C. and Kroon, A.M., eds.) Amsterdam: North-Holland, pp. 143-154 (1976)

Kotylak, Z. and Slonimski, P.P.: Mitochondrial mutants isolated by a new screening method based upon the use of the nuclear mutation op1. In: Mitochondria 1977 (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F., eds.) Walter de Gruyter, Berlin, pp. 83-89 (1977 a)

Kotylak, Z. and Slonimski, P.P.: Fine structure genetic map of the mitochondrial DNA region controlling coenzyme QH_2-cytochrome c reductase. In: Mitochondria 1977 (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F., eds.) Walter de Gruyter, Berlin, pp. 161-172 (1977 b)

Kováčová, V., Irmlerová, J. and Kováč, L.: Oxidative phosphorylation in yeast IV. Combination of a nuclear mutation affecting oxidative phosphorylation with cytoplasmic mutation to respiratory deficiency. Biochim. Biophys. Acta 162, 157-163 (1968).

Kreike, J., Bechmann, H., van Hemert, F.J., Schweyen, R.J., Boer, P.H., Kaudewitz, F. and Groot, G.S.P.: The identification of apocytochrome b as a mitochondrial gene product and immunological evidence for altered apocytochrome b in yeast strains having mutations in the COB region of mitochondrial DNA. Eur. J. Biochem. 101, 607-617 (1979)

Kutzleb, R., Schweyen, R.J. and Kaudewitz, F.: Extrachromosomal inheritance of paromomycin resistance in Saccharomyces cerevisiae. Genetic and biochemical characterization of mutants. Mol. Gen. Genet. 125, 91-98 (1973)

Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685 (1970)

Lancashire, W.E. and Mattoon, J.R.: Cytoduction: A tool for mitochondrial genetic studies in yeast. Mol. Gen. Genet. 170, 333-344 (1979)

Lazowska, J., Jacq, C. and Slonimski, P.P.: Sequences of introns and flanking exons in wild-type and box 3 mutants of cytochrome b reveals an interlaced splicing protein coded by an intron. Cell 22, 333-348 (1980)

Lewin, B.: Alternatives for splicing: Recognizing the ends of introns. Cell 22, 324-326 (1980)

Li, M. and Tzagoloff, A.: Sequences of yeast mitochondrial valine and an unusual threonine tRNA gene. Cell 18, 47-53 (1979)

Macchechini, M.-L., Rudin, Y., Blobel, G. and Schatz, G.: Import of proteins into mitochondria: Precursor forms of the extramitochondrially made F_1-ATPase subunits in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 343-347 (1979)

Mahler, H.R., Hanson, D., Miller, D., Bilinski, T., Ellis, D.M., Alexander, N.J. and Perlman, P.S.: Structural and regulatory mutations affecting mitochondrial gene products. In: Mitochondria 1977 (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F., eds.) Walter de Gruyter, Berlin, pp. 345-370 (1977)

Nagley, P. and Linnane, A.W.: Mitochondrial DNA deficient mutants in yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 989-996 (1970)

Needlman, R.B. and Tzagoloff, A.: Breakage of yeast: A method for processing multiple samples. Anal. Biochem. 64, 545-549 (1975)

Nobrega, F.G. and Tzagoloff, A.: Assembly of the mitochondrial membrane system. Complete restriction map of the cytochrome b region of mitochondrial DNA in Saccharomyces cerevisiae D273-10B. J. Biol. Chem. 255, 9821-9827 (1980 a)

Nobrega, F.G. and Tzagoloff, A.: Assembly of the mitochondrial membrane system. DNA sequence and organization of the cytochrome b gene in Saccharomyces cerevisiae D273-10B. J. Biol. Chem. 255, 9828-9837 (1980 b)

Pajot, P., Wambier-Kluppel, M.L., Kotylak, Z. and Slonimski, P.P.: Regulation of cytochrome oxidase formation by mutations on a mitochondrial gene for cytochrome b. In: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria (Bücher, Th., Neupert, W., Sebald, W. and Werner, S., eds.) Amsterdam, North-Holland, pp. 443-452 (1976)

Pajot, P., Wambier-Kluppel, M.L. and Slonimski, P.P.: Cytochrome c reductase and cytochrome oxidase formation in mutants and revertants in the "BOX" region of mitochondrial DNA. In: Mitochondria 1977 (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F., eds.) Walter de Gruyter, Berlin, pp.173-183 (1977)

Pratje, E. and Michaelis, G.: Resistance to high concentrations of antimycin A in Saccharomyces cerevisiae: Synergistic interaction of nuclear and mitochondrial mutations. In: Mitochondria 1977 (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F., eds.) Walter de Gruyter, Berlin, pp. 199-204 (1977)

Rabinowitz, M., Jakovcic, S., Martin, N., Hendler, F., Halbreich, A., Lewin, A. and Morimoto, R.: Transcription and organisation of yeast mitochondrial DNA. In: The Genetic Function of Mitochondrial DNA (Saccone, C. and Kroon, A. M., eds.) Amsterdam, North-Holland, pp. 219-230 (1976)

Schatz, G. and Mason, T.L.: The biosynthesis of mitochondrial proteins. Ann. Rev. Biochem. 43, 51-87 (1974)

Schmelzer, C., Haid, A., Grosch, G., Schweyen, R.J. and Kaudewitz, F.: Pathways of transcript splicing in yeast mitochondria: Mutations in intervening sequences of the split gene COB reveal a requirement for IVS encoded products. J. Biol. Chem., in Druck, (1981)

Schweyen, R.J. and Kaudewitz, F.: Protein synthesis by mitochondria in vivo. Quantitative estimate of mitochondrially governed synthesis of mitochondrial proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 728-735 (1970)

Schweyen, R.J., Weiss-Brummer, B., Backhaus, B. and Kaudewitz, F.: The genetic map of the mitochondrial genome including the fine structure of COB and OXI 3 clusters. In: Mitochondria 1977 (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F., eds.) Walter de Gruyter, Berlin, pp. 139-148 (1977)

Schweyen, R.J., Weiss-Brummer, B., Backhaus, B. and Kaudewitz, F.: The genetic map of the mitochondrial genome in yeast. Map positions of *drug*^{r} and *mit*$^{-}$ markers as revealed from population analysis of rho^{-} clones in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet. 159, 151-160 (1978)

Sebald, W., Sebald-Althaus, M. and Wachter, E.: Altered amino acid sequence of the DCCD-binding protein of the nuclear oligomycin-resistant mutant AP-2 from Neurospora crassa. In: Mitochondria 1977 (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F., eds.) Walter de Gruyter, Berlin, pp. 433-440 (1977)

Showe, M.K., Isobe, E. and Onorato, L.: Bacteriophage T4 prehead proteinase. II. Its cleavage from the product of gene 21 and regulation in phage-infected cells. J. Mol. Biol. 107, 55-69 (1976)

Slonimski, P.P. and Tzagoloff, A.: Localization in yeast mitochondrial DNA of mutations expressed in a deficiency of cytochrome oxidase and/or coenzyme QH_2-cytochrome *c* reductase. Eur. J. Biochem. 61, 27-41 (1976)

Slonimski, P.P., Pajot, P., Jacq, C., Foucher, M., Perrodin, G., Kochko, A. and Lamouroux, A.: Mosaic organization and expression of the mitochondrial DNA region controlling cytochrome *c* reductase and oxidase. I - Genetic, physical and complementation maps of the *box* region. In: Biochemistry and Genetics of Yeasts (Bacila, M., Horecker, B.L.

and Stoppani, A.O.M., eds.) Academic Press, New York, pp. 339-367 (1978 a)

Slonimski, P.P., Claisse, M.L., Foucher, M., Jacq, C., Kochko, a., Lamouroux, A., Pajot, P., Perrodin, G., Spyridakis, A. and Wambier-Kluppel, M.L.: Mosaic organization and expression of the mitochondrial DNA region controlling cytochrome c reductase and oxidase. III - A model of structure and function. In: Biochemistry and Genetics of Yeast (Bacila, M., Horrecker, B.L. and Stoppani, A.O.M., eds.) Academic Press, New York, pp. 391-401 (1978 b)

Solioz, M. and Schatz, G.: Mutations in putative intervening sequences of the mitochondrial cytochrome b gene of yeast produce abnormal cytochrome b polypeptides. J. Biol. Chem. 254, 9331-9334 (1979)

Thomas, D.Y. and Wilkie, D.: Recombination of cytoplasmic drug-resistance factors in Saccharomyces cerevisiae. Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 368-372 (1968)

Tzagoloff, A., Rubin, M.S. and Sierra, M.F.: Biosynthesis of mitochondrial enzymes. Biochim. Biophys. Acta 301, 71-104 (1973)

Tzagoloff, A., Akai, A. and Needleman, R.B.: Properties of cytoplasmic mutants of Saccharomyces cerevisiae with specific lesions in cytochrome oxidase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 2054-2057 (1975 a)

Tzagoloff, A., Akai, A., Needleman, R.B. and Zulch, G.: Assembly of the mitochondrial membrane system. Cytoplasmic mutants of Saccharomyces cerevisiae with lesions in enzymes of the respiratory chain and in the mitochondrial ATPase. J. Biol. Chem. 250, 8236-8242 (1975 b)

Tzagoloff, A., Foury, F. and Akai, A.: Assembly of the mitochondrial membrane system XVIII. Genetic loci on mitochondrial DNA involved in cytochrome b biosynthesis. Mol. Gen. Genet. 149, 33-42 (1976)

Tzagoloff, A., Macino, G. and Sebald, W.: Mitochondrial genes and translation products. Ann. Rev. Biochem. 49, 419-441 (1979)

Tzagoloff, A., Bonitz, S.G., Coruzzi, G., Thalenfeld, B.E. and Macino, G.: Yeast mitochondrial cytochrome oxidase genes. In: The Organisation and Expression of the Mitochondrial Genome (Kroon, A.M. and Saccone, C., eds.) Amsterdam, North-Holland, pp. 181-190 (1980)

Van Ommen, G.J.B. and Groot, G.S.P.: Transcription map of yeast mitochondrial DNA. In: Mitochondria 1977 (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F., eds.) Walter de Gruyter, Berlin, pp. 415-424 (1977)

Van Ommen, G.J.B., Groot, G.S.P. and Grivell, L.A.: Transcription maps of the mtDNAs of two strains of Saccharomyces: Transcription of strain-specific insertions; complex RNA maturation and splicing. Cell 18, 511-523 (1979)

Van Ommen, G.J.B., Boer, P.H., Groot, G.S.P., De Haan, M., Roosendaal, E., Grivell, L.A., Haid, A. and Schweyen, R.J.: Mutations affecting RNA splicing and the interaction of gene expression of the yeast mitochondrial loci cob and oxi 3 . Cell 20, 173-183 (1980)

Wachter, E., Sebald, W. and Tzagoloff, A.: Altered amino acid sequence of the DCCD-binding protein in the oli 1 resistant mutant D273-10B/A21 of Saccharomyces cerevisiae. In: Mitochondria 1977 (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F., eds.) Walter de Gruyter, Berlin, pp. 441-449 (1977)

Weiss, H. and Ziganke, B.: Cytochrome b in Neurospora crassa mitochondria. Site of the translation of the heme protein. Eur. J. Biochem. 41, 63-71 (1974)

Weiss-Brummer, B., Guba, R., Haid, A. and Schweyen, R.J.: Fine structure of OXI 1, the mitochondrial gene coding for subunit II of yeast cytochrome c oxidase. Current Genetics 1, 75-83 (1979)

Die vorliegende Arbeit hätte nicht ohne Hilfe und Unterstützung des Genetischen Instituts der Universität München und der Molekularbiologischen Abteilung der Universität Amsterdam sowie deren Mitarbeitern durchgeführt werden können.
Mein besonderer Dank gilt:
Herrn Prof. Dr. F. Kaudewitz für die Bereitstellung des Themas, Beratung und großzügige Förderung der Arbeit;
Herrn Prof. Dr. R. J. Schweyen für die Unterstützung bei der experimentellen Durchführung der Arbeit, besonders des genetischen Teils und seine stete Diskussionsbereitschaft;
Herrn Dr. A. Haid für seine Anregungen und praktischen Hinweise der biochemischen Versuchsdurchführung;
Herrn Prof. Dr. P. Borst und seinen Mitarbeitern in Amsterdam für ihre Hilfestellung während meines Gastaufhaltes, die Bereitstellung von Antiserum gegen Apocytochrom b und ihr Interesse an den Versuchsergebnissen;
für die Überlassung von einzelnen mit⁻-Mutanten und rho⁻-Klonen Herrn Prof. P. Slonimski, für Immunseren gegen Apocytochrom b und Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase Herrn Dr. M. Solioz und Prof. G. Schatz, Basel.

Der Universität München danke ich für die Bewilligung eines Graduiertenstipendiums, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung von Geldmitteln und der Kommission der Europäischen Gemeinschaft für die Finanzierung eines 6-wöchigen Arbeitsaufenthalts in der Molekularbiologischen Abteilung der Universität Amsterdam.

L E B E N S L A U F

Name	Helga Bechmann-Holzner geb. Bechmann	
Beruf	Diplom-Biologin	
geboren	am 2. Januar 1944 in Breslau, Schlesien	
Nationalität	deutsch	
Familienstand	verheiratet	
Eltern	Heinz Bechmann, Diplom-Ingenieur Elsa Bechmann geb. Eifler	
Schulbildung	1950-1954	ev. Volksschule in Ehrang bei Trier
	1954-1959	Auguste-Viktoria-Gymnasium in Trier
	1959-1961	Winthir-Oberrealschule in München
	1968-1970	Oberstufenlehrgänge der Abendrealschule, München; Begabtenabitur des bayrischen Kultusministeriums
Berufs-ausbildung	1961-1963	Chemieschule Dr. E. Elhardt, München; Abschluß als staatlich geprüfte Chemotechnikerin mit Sonderkurs Biochemie
	1970-1974	Biologiestudium an der Technischen Universität München mit Fachrichtung Mikrobiologie
	1975-1976	Diplomarbeit am Genetischen Institut der Universität München, Studienabschluß mit Diplom in Biologie
	1976	Beginn der Dissertationsarbeit bei Prof. Kaudewitz am Genetischen Institut der Universität München
Berufs-tätigkeit	1964-1965	Chemotechnikerin am Max-Planck-Institut für Biochemie München
	1965-1968	Laboratory of Genetics der University of Wisconsin, Madison, Wisc., USA
	1977-1980	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Genetischen Institut der Universität München
	seit 1980	Diplom-Biologin im Labor für Gewebetypisierung und Immungenetik Prof. Albert, Polikinderklinik der Universität München